

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Keemia instituut

Elmo Libek

**LC/ESI/MS MEETODI VÄLJATÖÖTAMINE PESTITSIIDIJÄÄKIDE
MÄÄRAMISEKS**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Anneli Kruve, PhD

Tartu, 2014

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	3
1. SISSEJUHATUS.....	4
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
2.1. Pestitsiidid	5
2.2. Pestitsiidide määramise meetodid	6
2.3. Proovi ettevalmistus pestitsiidide analüüsil.....	6
2.4. Elektropihustusionisatsioon.....	7
2.5. Massispektromeetria.....	9
2.6. Pöördfaaskromatograafia.....	10
2.7. Maatriksefekt	11
2.8. Valideerimine	12
3. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID	14
3.1. Kasutatud ained	14
3.2. Aparatuur.....	14
3.3. Vedelikkromatograafia meetod	15
3.4. Massispektromeetri parameetrid.....	15
3.5. Proovi ettevalmistamine QuEChERS meetodil.....	15
3.6. Lahused.....	17
3.7. Arvutused.....	17
4. TULEMUSED.....	19
4.1. Pestitsiidide ioniseerumine ja MS^2 parameetrite optimeerimine.....	19
4.2. Gradiendi optimeerimine	19
4.3. Massispektromeetriline meetod	20
4.4. Valideerimine	21
4.5. Pädevuskatsed IMEP-37.....	24
5. TULEMUSTE ARUTELU	27
5.1. Pestitsiidide ioniseerumine	27
5.2. Valideerimistulemuste headus SANCO kriteeriumite alusel	28
5.3. Pädevuskatsete tulemused	33
5.4. Avastamis- ja määramispiiri võrdlus lineaarse ala algusega	35
5.5. Pestitsiidide identifitseerimine	35
KOKKUVÕTE.....	36
SUMMARY	37
6. KASUTATUD KIRJANDUS	38
Lisa.....	40
Käesolevas töös uuritud pestitsiidide struktuurvalemid.....	40
Pädevuskatsete graafikud ja tabelid	46

KASUTATUD LÜHENDID

%ME	maatriksefekt
%PE	protsessiefektiivsus
%S	saagis
AOAC	Rahvusvaheline Analüüsikeemikute Ametlik Assotsiatsioon
APCI	atmosfäärirõhuline keemiline ionisatsioon
<i>c</i>	kontsentratsioon (mg/kg)
ESI	elektropihustusionisatsioon
IMEP	Rahvusvaheline Laboritevaheline Võrdlusmõõtmiste Programm
LC	vedelikkromatograafia
LoD	avastuspiir
LoQ	määramispiir
<i>m/z</i>	massi-laengu suhe
MeCN	atsetonitriil
MRL	maksimaalne lubatud piirnorm
MS	massispektromeetria
MS/MS	tandem-massispektromeetria
MS ⁿ	tandem-massispektromeetria
PSA	primaarne sekundaarne amiin (<i>primary secondary amine</i>)
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i> proovi ettevalmistamise meetod
RSD	suhteline standardhälve
SANCO	Euroopa Komisjoni Tervishoiu- ja Tarbijakaitse Peadirektoraat
<i>t_R</i>	retentsiooniaeg (min)

1. SISSEJUHATUS

Väärarengud, häired organismi töös ning haigused on ühed vähestest tagajärgedest, mis võivad kaasneda pestitsiidide rohke toidu tarbimisega. Samas on pestitsiidide kasutamine möödapääsmatu põllumajanduses ja toiduainetööstuses. Seetõttu on oluline kontrollida pestitsiidijääkide sisaldust toiduainetes.

Tartu Ülikooli Katsekojas on olemas LC/ESI/MS meetod polaarsete pestitsiidide määramiseks. Selle meetodiga on võimalik määrata kümnekonda pestitsiidi. Maailmas on põllumajanduses kasutuses tuhandeid pestitsiide ning seetõttu on igati kohane suurendada uuritavate pestitsiidide hulka.

Sellest lähtuvalt seati töö eesmärgiks täiendada Katsekoja kompetentsi pestitsiidide jääkide määramisel järgmiselt:

- uurida olemasolevate pestitsiidide ioniseerumist erinevate ioonallikatega tuvastamaks, milliseid pestitsiide on võimalik tulevikus MS meetodil analüüsida;
- koostada LC/ESI/MS meetod pestitsiidide kvantitatiivseks määramiseks;
- kontrollida koostatud meetodi sobilikkust valideerimise käigus;
- kontrollida väljatöötatud meetodi tulemuste täpsust Rahvusvahelise Laboritevahelise Võrdlusmõõtmiste Programmi raames.

Eesmärkide täitmiseks töötati välja 32 pestitsiidi sisaldav LC/ESI/MS meetod ning määrati lineaarne ala, korduvus, tõesus, avastamis- ja määramispiir tomatimaatriksis ning osaleti pädevuskatsetes (IMEP-37).

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Pestitsiidid

Pestitsiidid on ained või ainete segud, mis tõhusalt hävitavad ja tõrjuvad kahjureid ning takistavad või leevendavad nende põhjustatud kahjusid. Kahjuriteks võivad olla putukad, hiired, umbrohi, seemed, mikroorganismid, nagu bakterid ja viirused, ning prioonid. Pestitsiidide kasutamine võimaldab suurendada põllumajanduslikku tootlikkust ning vähendada kahjurite põhjustatud taimede haiguseid. Seetõttu kasutatakse Euroopa Liidus põllumajanduslikul eesmärgil enam kui 140 000 tonni pestitsiide aastas. [1]

Pestitsiidid saab jagada kolme suurde gruppi vastavalt sellele, millistele organismidele nad suunatud on: insektitsiidid ehk putukamürgid, herbitsiidid ehk taimemürgid ja fungitsiidid ehk seenhaiguste tõrjepreparaadid. Lisaks nendele on olemas veel rodentitsiidid ehk näriliste mürgid selgroogsete kahjurite tõrjumiseks, molluskitsiidid nälkjate ja tigude tõrjeks ning akaritsiidid lestade tõrjeks. Pestitsiidid erinevad oma keemilise struktuuri, toimemehhanismi ja mürgisuse poolest. [1]

Pestitsiide on võimalik grupeerida ka nende keemilise struktuuri alusel. Näiteks kuuluvad insektitsiidide hulka kloororgaanilised, fosfororgaanilised, karbamaatsed ja paljud teised ühendid. Kloororgaanilised süsivesinikud (diklorodifenüültriikloroetaan, heptakloor) toimivad, häirides naatriumi ja kaaliumi tasakaalu närvikanalis. Fosfororgaanilised (paratioon, malatioon) ja karbamaatsed (karbarüül, karbofuraan) pestitsiidid pole niivõrd mürgised ning seetõttu asendavad need laialdaselt kloororgaanilisi ühendeid. Fosfororgaanilised pestitsiidid on ensüümi atsetüülkoliinesteraasi inhibiitorid, mistõttu võivad põhjustada halvatust. [1]

2.1.1. Pestitsiidijäägid puu- ja köögiviljadel

Kahjurid ja haigused mõjutavad puu- ning köögiviljade tootmist ja hoiustamist, tekitades kahjustusi, mis vähendavad saagikust ja toidu kvaliteeti. Vähendamaks tekkinud kahjustusi ning säilitamiseks viljade kvaliteeti, kasutatakse pestitsiide kombineeritult teiste tehnikatega. Samas võib pestitsiidide kasutamisest jääda jääke viljadesse ka pärast saagi koristust. [1]

Toidu ja vee suukaudne manustamine on levinuim viis pestitsiididega kokkupuuteks. Pestitsiidide mürgisus mõjub reproduktiivsuse süsteemile ja loote arengule. Samuti võivad need tekitada vähki ja astmat. Seetõttu on pestitsiidid toidus ja vees ohtlikeks saateaineteks. [1]

2.2. Pestitsiidide määramise meetodid

Peaegu eranditult viiakse pestitsiidide määramise analüüsid läbi kromatograafia (gaasi- või vedelikkromatograafia (LC)) abil, koos erinevate detektoritega. Detektoritest kasutatakse pestitsiidide määramisel kõige enam kõrge selektiivsusega massispektromeetrilist (MS) detektorit. [2]

Mõningatesse keemilistesse klassidesse kuuluvaid pestitsiide saab analüüsida nii gaasi- kui ka vedelikkromatograafiaga. Juhul, kui ühendi analüüsimiseks gaasikromatograafia meetodil on vajalik derivatiseerimine, siis eelistatakse kasutada LC analüüsi. Paljud tänapäeval analüüsitavatest pestitsiididest ei sobi gaasikromatograafiliseks analüüsiks, kuna need on kõrgel temperatuuril kergesti lagunevad, polaarsed ning vähe lenduvad. [2]

Kromatograafilised meetodid on aeganõudvad, vajavad keerulisi seadmeid ning ajamahukat proovide ettevalmistamist. Seetõttu on leitud mõningaid alternatiivseid meetodeid, näiteks kasutatakse pestitsiidide analüüsimisel immunoloogilist analüüsi, mis on kiire, odav ja lihtne. Valmistatud on ka erinevaid biosensoreid, mis võimaldavad *on-line* ja lokaalseid analüüse. Näiteks saab atsetüülkoliinesteraasi põhiste biosensoritega määrata fosfororgaaniliste ja karbamaatsete pestitsiide sisaldust. [2]

2.3. Proovi ettevalmistus pestitsiidide analüüsil

Pestitsiidi jälgede tuvastamisel keerulistest maatriksitest on enne instrumentaalset analüüsi vaja proovi ulatuslikult ekstraheerida ja töödelda. Toiduproovide ettevalmistuse käigus viiakse analüüdid oma esmasest maatriksist sobivasse solventi samaaegselt proovi segavatest ainetest puhastades. Vajadusel kontsentreeritakse proovi, et analüütide sisaldus oleks antud analüütilise meetodi avastuspiirist suurem. Tahketest toiduproovidest ekstraheeritakse analüüdid lahusesse. Paljude võimalike tehnikate hulgast kasutatakse pestitsiidide määramisel kõige enam:

- solvendiga ekstraheerimist;
- Soxhlet ekstraktsiooni;
- ultraheliekstraheerimist;
- ekstraktsiooni mikrolainete abiga ja
- kiirendatud solvendiga ekstraheerimist. [3, 4]

Tüüpilised etapid proovi ettevalmistamisel on homogeniseerimine, ekstraheerimine, puhastamine ning kontsentreerimine. Mõningatel juhtudel lisandub veel analüüdi derivatiseerimine. [3]

Üks õnnestunumaid arendusi pestitsiidide määramise valdkonnas on meetod, mida tuntakse QuEChERS-i nime all. See on akronüüm sõnadest *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* ja *Safe* tähistades, et see meetod on kiire, lihtne, odav, robustne, efektiivne ja ohutu. Antud meetodit tutvustasid 2003. aastal pestitsiidide määramiseks puu- ja köögiviljades Anastassiades jt [5]. See on kaheastmeline protseduur, mis põhineb dispergeeritud tahke faasi ekstraksioonil. Meetod näeb ette proovi algset töötlemist magneesiumsulfaadiga, et tagada vee eraldumine orgaanilisest solvendist. Sellele järgneb töötlus primaarse sekundaarse amiiniga (PSA). PSA on sorbent, mis aitab eemaldada polaarset aineid nagu orgaanilised happed, mõningaid suhkruid ja polaarset pigmente. Kiire ja tõhus QuEChERS meetod võeti pestitsiidijääkide proovi ettevalmistusel kiiresti omaks ning seda on hakatud rakendama ka teist tüüpi analüüsile. [6]

QuEChERS ekstraheerimisega on võimalik saada kvaliteetseid tulemusi – kõrgeid saagiseid, head korratavust ja korduvust. Samuti võimaldab see meetod määrata erinevate omadustega analüüte. Lisaks on meetod väga praktiline – tekib vähe jääke, on odav, ei võta palju ruumi, kulub vähe nõusid ning võimaldab palju proove korraga ekstraheerida. Suure eelisena on võimalik sama solventi kasutada nii apolaarsete kui ka polaarset pestitsiidide ekstraheerimisel ning saadud ekstrakti saab koheselt pärast puhastamist sisestada kromatograafi ilma, et proovi oleks täiendavalt vaja kontsentreerida. [7]

2.4. Elektropihustusionisatsioon

Elektropihustusionisatsioon (ESI) on meetod, millega on võimalik lahustunud ained viia vedelikust ioonidena gaasifaasi. Seetõttu on tegemist enimkasutatava LC ja MS vahelise liidesega. Tekitatud gaasifaasilisi ioone saab analüüsida massi-laengu suhte (m/z) alusel MS-ga. ESI leiab rakendusi paljudes valdkondades, näiteks biokeemilistes, biomeditsiinilistes ja farmatseutilistes uuringutes. See võimaldab edukalt uurida polümeere, nukleiinhappeid, valke ning teisi kõrge molekulmassiga molekule, samas on see ka asendamatu ravimite, looduslike ainete, süsivesinike, pestitsiidide ja teiste väikeste molekulide analüüsimisel. ESI/MS olulisust on tunnustatud ka Nobeli preemiaga, mis anti John Fennile 2002. aastal ESI/MS meetodi arendamise eest. [8, 9]

ESI on selektiivne ionisatsioonitehnika, mida võib edukalt kasutada paljude analüütide jaoks, kuid esineb ka analüüte, millele ESI ei sobi. Tähtsaim selektiivsuse allikas ESI puhul on see, kas huvi pakkuvat analüüti on võimalik viia ioonsele kujule, kuna massispektromeetriselt on võimalik detekteerida ainult neid analüüte, mis on viidud

ioonidena gaasifaasi. Enamasti toimub ioniseerumine läbi protoneerumise (positiivses režiimis) või deprotoneerumise (negatiivses režiimis). [8]

ESI võimaldab uurida ka analüüte, mis pole oma olemuselt laetud ega saa protoneeruda või deprotoneeruda. Üheks selliseks mehhanismiks on laengu saamine adukti moodustumise teel. Polaarne orgaaniline molekul võib adukti moodustada katiooniga (Na^+ , Li^+ , K^+ , NH_4^+) või aniooniga (Cl^- , CH_3CO_2^-). Erinevad soolad võivad väikestes kogustes esineda lisanditena solventides ja see võib lihtsustada adukti moodustumist. Näiteks saab aduktioon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ moodustuda analüüdist ja naatriumioonist, mis võib olla pärit kasutatud klaasnõudest. [8]

Kolmas moodus, kuidas analüüdid võivad ESI käigus laengu saada, on redoksreaktsioon. Selleks, et eksisteeriks vool ESI süsteemi vooluringis, peab toimuma oksüdeerumine (ESI positiivsete ionide määramise režiimis) või redutseerumine (ESI negatiivsete ionide määremise režiimis) ESI nõelal. Olenevalt analüüsi tingimustest võivad oksüdeeruda analüüt, solvent või lisandid. Näiteks muutuvad polüaromaatsed süsivesinikud oksüdeerumisel tuvastatavateks ionideks. Sellegipoolest võivad oksüdeerumis- ja redutseerumisreaktsioonid olla ka analüüsi segavad, juhul kui nende protsesside käigus analüüt laguneb [9]. Sarnane mõju võib esineda ka olukorras, kus ioonsed produktid moodustuvad lahustist või teistest lisanditest ning muudavad massispektri keeruliseks ja võivad analüüdi signaali maha suruda. [8]

Enne, kui proov jõuab massianalüsaatorisse, peavad analüüdid läbima atmosfäärirõhulise piirkonna, mis sisaldab palju solvendimolekule ja teisi gaasifaasilisi osakesi. Gaasifaasiline prootonülekanne analüüdi- ja solvendimolekuli vahel võib mõjutada osakeste detekteerimist massispektromeetriliselt – see võib muuta analüüsitavate valkude laengut ning selektiivsust ka väikeste molekulide puhul. Kui ESI-s esineb gaasifaasiline prootonülekanne, siis toimub see üldiselt suures liias olevate solvendimolekuliga. Sellised reaktsioonid võivad põhjustada signaali mahasurumist. Näiteks positiivses ESI režiimis analüüt neutraliseerub andes oma prootoni solvendimolekulile. Kui analüüt peaks gaasifaasi sattuma neutraalsel kujul, siis on võimalik, et analüüt saab läbi gaasifaasiliste reaktsioonide endale laengu. Siiski on leitud, et massispektromeetrilise signaali tugevus korreleerub pigem happelisusega vesilahustes kui gaasifaasilise prootonafiinsusega. [8]

Gaasifaasiliste ionide tekkimisel elektrolüüdilahusest ESI käigus on kolm põhilist etappi:

- 1) laetud tilkade tekitamine elektropihustuskapillaari otsas;
- 2) tekkinud laenguga tilkade suuruse vähenemine lahusti aurustumise ning korduvate tilkade lagunemiste tõttu, mille tulemusel tekivad tugevalt laetud väiksemad tilgad, mis on võimelised emiteerima gaasifaasilisi ioone;
- 3) gaasifaasiliste ionide tekkimine väikestest ning tugevalt laetud tilkadest. [8]

Gaasifaasiliste ionide tekkimise mehhanismi kohta kolmandas etapis on mitmeid erinevaid seletusi. Enim käsitletud on iooni aurustumise mudel (*ion-evaporation model*) ja jääklaengute mudel (*charge-residue model*). Vastavalt iooni aurustumise mudelile muutuvad tilgad järjest väiksemaks kuni olukorrani, kus laengute omavaheline tõukumine on piisavalt tugev, et saaks esineda ionide aurustumine tilgast gaasifaasi. Jääklaengute mudeli korral toimuvad kulonilised lagunemised, kuni moodustuvad tilgad, mis koosnevad ühest ionist ja solvendi molekulidest. Solvendi aurustumine tilgast jätkub, kuni analüüt jääb koos tilgas olnud laengutega üksi gaasifaasi. [10]

Kõik need etapid toimuvad instrumendi atmosfäärirõhulises piirkonnas. Ioonid, mis tekivad nende protsesside käigus, sisenevad läbi väikese avause ESI liidese vaakumpiirkonda, mis juhib ioonid massispektromeetrisse. Tekkinud ioonid võivad olla seotud solvendimolekulidega või teiste lisanditega. Nendest vabanemine toimub soojendatavas kapillaaris, mis juhib ioonid eelvaakum-kambrisse. [8]

2.5. Massispektrometria

Massispektrometria võimaldab hea tundlikkuse ning madalate avastuspiiridega kiireid analüütilisi mõõtmisi ning omab laialdaselt kasutusalasid. Tema uusimad kasutusala on enamasti bioanalüütika valdkonnast. Samas kasutatakse seda ka rutiinselt analüütilises keemias saasteainete ja toidu kontrolliks, kohtueksperdiis, looduslike ühendite või protsesside jälgimiseks. [11]

2.5.1. Massianalüsaatorid

Pärast ionallika poolt tekitatud gaasifaasiliste ionide tekitamist eraldatakse need vastavalt m/z väärtusele. Kõik massianalüsaatorid kasutavad ionide eraldamiseks elektri- ja magnetvälja, kas eraldiseisvalt või kombineeritult. Analüsaatoreid saab jaotada ionikiirega instrumentideks ja ioone lõksustavateks instrumentideks, mis võivad ioone analüüsida vastavalt järjestikku või tsüklitena. Levinuimad lõksustavad massianalüsaatorid on ionilõks, Fourier' teisendusega *orbitrap* ning Fourier' teisendusega ioontsüklotronresonants

massianalüsaator. Tuntuimad järjestikku skaneerivad instrumendid on aga elektriline sektor, magnetiline sektor, kvadruupool- ning lennuajamassianalüsaator. [11]

2.5.1. Tandem-massispektromeetria

Tandem-massispektromeetriaks (MS/MS) nimetatakse meetodit, kus kasutatakse massianalüüsil vähemalt kahte astet, mis on seotud kas dissotsiatsiooniprotsessiga või keemiliste reaktsioonidega, mille tulemusel iooni m/z muutub. Esimest massianalüüsi kasutatakse eellasiooni eraldamiseks. Eellasioon fragmenteerub (spontaanselt või aktiveerimise tõttu) ning tekivad produkt- ehk fragmentioonid ja neutraalsed fragmendid. Teise massianalüüsi käigus detekteeritakse fragmentioonid – selle tulemusel saadakse fragmentioonide spekter. Võimalik on kasutada veel kõrgemat järku massianalüüsi kui teisel massianalüüsil saadud fragmentioonidest valida üks ioon ning analüüsida sellest ionist fragmentatsioonil tekkivaid ioone. Siis on tegu MS/MS/MS või MS^3 analüüsiga. Üldiselt saab seda väljendada tähistusega MS^n , kus n viitab numbrile, mitmes järgus ioone on analüüsitud. [11]

Tandem-massispektromeetria jaguneb kaheks: MS/MS ruumis (näiteks kolmekordne kvadruupool-massianalüsaator), kus on omavahel füüsiliselt ühendatud eraldiseisvad massianalüsaatorid, ja MS/MS ajas (näiteksioonlõks massianalüsaator), mille puhul viiakse massianalüsaatoris läbi kindel ionide analüüsimise ja fragmenteerimise järjestus. [11]

Tandem-massispektromeetriat on võimalik kasutada iooni struktuuri väljaselgitamiseks, fragmenteerumise mehhanismide uurimiseks, elemendilise koostise tuvastamiseks ning kõrge tundlikkuse ja selektiivsusega analüüsideks. [11]

Selektiivse MS/MS meetodi väljatöötamiseks on vaja kõigepealt uurida fragmenteerumisreaktsioone. Sellist tuvastamismeetodit saab kombineerida kromatograafilise eraldamisega, mis koos võimaldavad selektiivselt analüüsida keerulisi segusi. Peale selle võimaldab MS/MS oluliselt parandada signaali ja müra suhet. [11]

2.6. Pöördfaaskromatograafia

Pöördfaaskromatograafia on kõige laialdasemalt kasutatud LC meetod. See sobib hästi polaarsete ja ioonsete analüütide eraldamiseks. Pöördfaaskromatograafias kasutatakse statsionaarse faasina modifitseeritud silikageeli või mõnda teist mittepolaarset kolonni pakkematerjali. Mobiilse faasina kasutatakse vee või puhverlahuse segu orgaanilise solvendiga. [12]

Silikageeli pinda saab modifitseerida keemiliste reaktsioonidega – nii on võimalik silikageeli pinnale lisada pöördfaaskromatograafia omaseid oktüül- (C_8), oktaadetsüül-

(C18), fenüül- ja teisi rühmi. Kuna analüüdi ja seotud faasi vahelised van der Waalsi jõud on nõrgad, siis ainete retentsiooni mõjutavad tugevalt analüüdi ja solventi vahelised interaktsioonid. Aine retentsiooniaeg väheneb analüüdi polaarsuse suurenedes. [12]

Orgaanilise lahusti osakaal ning tüüp on tähtsad parameetrid retentsiooni reguleerimiseks. Kromatograafilist eraldamist, mille käigus kasutatakse ajas püsivat mobiilse faasi koostist, nimetatakse isokraatiliseks elueerimiseks. Kui mobiilse faasi koostis analüüsi ajal muutub, siis nimetatakse seda gradientelueerimiseks. Juhul kui analüüsitava segu koostisosad on suhteliselt laia polaarsuste vahega, siis on gradientelueerimise abil võimalik lühendada komponentide eraldamiseks kuluvat aega ning saavutada parem efektiivsus. [12, 10]

Tihti kasutatakse pöördfaaskromatograafias puhvreid, mis võimaldavad kontrollida analüütide ionisatsioonimäära ning seeläbi ka piikide sabatamist ja retentsiooni korratavust. Puhvrite valik on suur, küll aga on enamik neist mittelenduvaid komponente sisaldavad puhvrid. LC/MS puhul eelistatakse lenduvate, näiteks ammoniumatsetaadi põhiste puhvrite kasutamist, kuna mittelenduva puhvri molekulid saastaksid MS sisendit, millest tulenevalt väheneks detektori võimekus. [10]

2.7. Maatriksefekt

LC/ESI/MS/MS-i kasutatakse tihti ainete määramiseks keerulistest maatriksitest, lootes, et MS/MS suudab edukalt filtreerida erineva m/z väärtusega ioone. Sellest olenemata on vaja pöörata tähelepanu analüüdiga koos elueeruvate maatriksi komponentide segavatele mõjutustele. Aina enam kasutatakse LC/ESI/MS/MS-i paljude analüütide analüüsimiseks üheaegselt, kusjuures proovi ettevalmistus on vähene või puudub üldse ning kromatograafiline eraldamine on viidud minimaalseks. [13]

Maatriksefekt esineb, kui analüüdiga samaaegselt elueeruvad maatriksist ekstraheerunud komponendid ning mõjutavad ESI ionisatsiooniefektiivsust. Maatriksefektide täpne mehhanism on küll teadmata, kuid on leitud, et tõenäoliselt on see põhjustatud erinevate jõudude poolt, mis tilka koos hoiavad ning ei lase väiksematel tilkadel moodustuda (kui on tegu ionisatsiooni mahasurumisega). Katsed on näidanud, et analüüt ja maatriksi komponendid konkureerivad ESI tilga pinnale pääsemise pärast. Seetõttu oleneb analüüdi ionisatsiooniefektiivsus suurel määral maatriksist, mis siseneb analüüdiga samaaegselt ESI allikasse. [13]

Maatriksefekti arvesse võtmiseks on kõige täpsem võimalus lisamismeetodi kasutamine, mis kahjuks suurendab analüüsitavate proovide arvu. Sisestandardeid ei kasutata

eriti mitme analüüdi määramise meetodite juures, kuna maatriksefekt sõltub suurel määral ainest. Ideaalne oleks kasutada isotoopmärgistatud standardeid – kahjuks pole neid aga sageli saada või on väga kallid. [14]

Euroopa Komisjoni Tervishoiu- ja Tarbijakaitse Peadirektoraat (SANCO) [15] on soovitanud maatriksefektide arvesse võtmiseks kasutada maatriksvastavaid kalibreerimislahuseid. Kuna kõikvõimalike maatriksite valmistamine on ebapraktiline, valitakse üks esinduslik maatriks ühe maatriksite grupi peale. [14]

Maatriksefekti (%ME) ehk ionisatsiooniefektiivsust saab arvutada järgneva valemi abil:

$$\%ME = \frac{\text{pärast ekstraheerimist spaigitud proovi pindala}}{\text{standardproovi pindala}} \times 100\%, \quad (1)$$

Maatriksefekti ei esine, kui %ME on võrdne 100%-ga. Kui see on üle 100%, siis on ionisatsioon võimendunud ja kui alla 100%, siis on toimunud ionisatsiooni mahasurumine. Sarnaselt sellele valemile on võimalik leida maatriksefekti ka kontsentratsioonide kaudu. Kontsentratsioonide kaudu arvutamine võtab arvesse ka kalibreerimisgraafiku vabaliiget, mille mõju arvutatavale maatriksefektile pole alati tühine ning kirjeldab paremini reaalseid proove. [14, 16]

2.8. Valideerimine

Meetodi valideerimine on mõiste, mida kasutatakse kirjeldamiseks toiminguid, mis viiakse läbi analüütilise meetodiga tõestamiseks, et antud meetodiga on võimalik saada kindlaksmääratud usaldusväärsusega tulemusi. Meetod valideeritakse otstarbeliseks kasutamiseks kindlatel tingimustel. Kui neid tingimusi muuta, siis on vaja meetod, vähemalt tehtud muutuste ulatuses, uuesti valideerida. [17]

Kui meetodi arendamisel ei lähtuta kliendi soovidest, siis on valideerimisprotsessiks antud erinevate meetodi karakteristikute väärtuste määramine ning raporteerimine. Sellise meetodi tulevane kasutaja saab hinnata, kas antud meetod sobib tema vajadustega. [17]

Paljudel tegevusaladel, eriti toidu ja tervishoiu valdkonnas, on nõuded täielikult valideeritud meetoditele määratletud seadusandluses. Meetodi valideerimisel tuleks lähtuda standarditest ja protokollidest, mis on väljastatud kontrollivate organisatsioonide poolt. [17]

2.8.1. Laborisisese valideerimisel meetodi suutlikkuse parameetrid

Tõesus (*trueness*) väljendab kui hästi langeb kokku analüütilise protseduuri käigus leitud keskmine väärtus referentsväärtuse või kokkuleppelise tõese väärtusega. [18]

Kordustäpsus väljendab analüütilise protseduuri mõõtmiste seeria tulemuste kokkulangevust ettenähtud tingimustel. Kordustäpsust väljendatakse mõõtmiste seeria standardhälbena või suhtelise standardhälbena (RSD). Kordustäpsust saab käsitleda kolmel tasemel korduvus, laborisisene korratavus (*intermediate precision*) ja korratavus. Korduvus väljendab lühikese aja jooksul samadel tingimustel tehtud mõõtmiste kordustäpsust. Laborisisene korratavus väljendab laborisiseseid varieeruvusi (nt analüüsi läbiviija, päev vms) ning korratavus näitab laboritevahelist kordustäpsust. [18]

Määramispiiriks (LoQ) on madalaim analüüdi kontsentratsioon või mass, mida on võimalik analüütilise meetodiga teatava täpsusega kvantitatiivselt määrata. Avastamispiiriks (LoD) on analüüdi madalaim kontsentratsioon või mass, mida on võimalik veel tuvastada, kuid ei ole võimalik esitada kvantitatiivselt täpse väärtusena. [18]

Lineaarne ala näitab kontsentratsioonide vahemikku, kus analüütiline protseduur on suuteline andma tulemusi, mis on otseselt proportsionaalsed analüüdi sisaldusega proovis. Analüütilise signaali lineaarsus võimaldab arvutusi lihtsustada. Lineaarset ala on võimalik määrata visuaalselt hinnates, aga eelistatud on kasutada jääkliikmete analüüsi. [18, 19]

3. MATERJALID, APARATUUR JA MEETODID

3.1. Kasutatud ained

Mobiilfaasi valmistamiseks kasutati metanooli (J. T. Baker, Holland, puhtus $\geq 99,9\%$) ja atsetaatpuhverlahust. Puhverlahus sisaldas 1 mM ammoniumatsetaati (Fluka, Saksamaa, puhtus $>99,0\%$) ning 0,1% sipelghapet (Sigma-Aldrich, Saksamaa, puhtus $\geq 98\%$). Mobiilfaasi valmistamiseks kasutati ülipuhast vett (eritakistus $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus $<6 \text{ mg/kg}$), mis valmistati deioniseeritud veest kasutades aparati Millipore Simplicity 185 (Millipore GmbH, Austria). Kõik pestitsiidide standardained, mida kasutati emalahuse valmistamiseks, pärinesid Dr. Ehrenstorfer GmbH-st (Saksamaa, puhtused $\geq 95\%$). Pestitsiidide struktuurvalemid on toodud lisas.

Proovi ettevalmistuse käigus kasutati atsetonitriili (MeCN) (Sigma-Aldrich, Iisrael, puhtus $\geq 99,9\%$) veevaba magneesiumsulfaati (Lach-Ner, Tsehhi, puhtus $99,4\%$), PSA-d (Supelco, USA) ning sipelghapet. Naatriumatsetaat (Reakhim, NSVL, analüütiline puhtus) vabastati veest kuumutamisel 100°C juures.

Pädevuskatsete viinamarjamaatriks valmistati Kagu Hispaanias Almerias kasvatatud viinamarjadest Euroopa Liidu Puu- ja Köögiviljades Pestitsiidide Jääkide Määramise Referentslabori poolt. Laboritele saadeti analüüside teostamiseks kaks portsjonit (umbes 210-250 g) külmutatud homogeenset viinamarjade segu, millest üht oli rikastatud pestitsiididega.

3.2. Aparatuur

Proovide analüüsimiseks kasutati LC/MS instrumenti firmalt Agilent. Instrument koosnes järgmistest osadest: Agilent 1100 seeria vaakumdegasaator, binaarne pump solvendi valiku klapiga, automaatne proovisisestussüsteem, kolonni termostaat kahele analüütilisele kolonnile, UV/Vis diodrividetektor jaioonlõks-massispektromeeter Agilent LC/MSD Trap XCT. LC ja MS vaheliseks liideseks oli ortogonaalse geomeetriaga ESI või atmosfäärirõhuline keemiline (APCI)ioonallikas, mille pihustus- ja kuivatusgaasiks kasutati lämmastikku. Massianalüsaatori lõksustus- ja pörkegaasiks oli heelium puhtusega 6.0 (Linde Gas, Saksamaa). Massispektromeetri parameetrite optimeerimiseks kasutati süstlapumpa Syringe Pump Model 100 (KD Scientific, USA) ning 1000 μl süstalt firmalt Agilent.

Töös kasutatud analüütiliseks kolonniks oli Zorbax Eclipse XDB-C18 pikkusega 250 mm, sisediameetriga 4,6 mm, osakese suurusega 5 μm . Eelkolonniks oli Eclipse XDB-C18 pikkusega 12,5 mm, sisediameetriga 4,6 mm, osakese suurusega 5 μm .

Erineva mahuga automaatpipetid pärinesid firmalt Eppendorf (Saksamaa). Proovide homogeniseerimiseks kasutati homogenisaator-veskit (Retsch GmbH & Co KG, Saksamaa).

Proovide ettevalmistamisel kasutati segajat firmalt VWR International (Saksamaa) ja tsentrifuugi 5430R firmalt Eppendorf (Saksamaa).

3.3. Vedelikkromatograafia meetod

Vedelikkromatograafia meetodis kasutati gradientelueerimist metanooli ja atsetaatpuhverlahusega (pH=2,8).

Analüüdilahuse sisestamiseks kasutati LC automaatset proovisisestussüsteemi. Süsti suuruseks oli 5 µl ja eluendi voolukiiruseks 0,8 ml/min, kolonni temperatuur oli 30 °C. Sobiv elueerimise gradientprogramm leiti optimeerimise teel ja on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Optimeeritud gradientprogramm pestitsiidide eraldamiseks, mobiilfaasi voolukiirus on 0,8 ml/min.

Aeg [min]	0	11	22	40	52	53	58	63
Metanool [%]	32	40	65	65	88	100	100	32

3.4. Massispektromeetri parameetrid

Kromatograafist väljuva joa pihustamiseks kasutati ESI allikas lämmastikku rõhul 50 psi (345 kPa). Kuivatusgaasi voolukiirus oli 12 l/min ning temperatuur 350 °C.

Kromatograafist väljuva joa pihustamiseks kasutati APCI allikas lämmastikku rõhul 60 psi (414 kPa). Kuivatusgaasi voolukiirus oli 5 l/min ning aurustusgaasi ja kuivatusgaasi temperatuurid olid 350 °C. Vool koroona nõelal oli 4000 nA.

Pestitsiidide määramiseks kasutatud eellas- ja fragmentioonid koos fragmenteerimisamplituudidega on toodud tabelis 2.

3.5. Proovi ettevalmistamine QuEChERS meetodil

Proov homogeniseeriti (1 min, 4000 rpm), vajadusel rikastati sobiva koguse pestitsiididega ning seejärel kaaluti $15,0 \pm 0,2$ g 50 ml-sse tsentrifuugituubi. Seejärel lisati antud järjekorras 15 ml 1% äädikhappe lahust atsetonitriilis (MeCN) (v/v), $6,0 \pm 0,1$ g veevaba magneesiumsulfaati ja $1,50 \pm 0,08$ g naatriumatsetaati. Saadud segu loksutati, et moodustuks homogeenne segu ning seejärel tsentrifuugiti 5000 rpm juures 7 minutit. Orgaanilisest faasist viidi 10 ml ekstrakti üle 15 ml-sse tsentrifuugituubi, kuhu oli eelnevalt kaalutud $0,50 \pm 0,05$ g PSA-d ning $1,50 \pm 0,08$ g veevaba magneesiumsulfaati. Tsentrifugituubi loksutati ning seejärel tsentrifuugiti 5000 rpm juures 7 minutit. Ekstrakt eraldati ning analüüsiti kohe või rikastati enne analüüsi pestitsiididega.

Alati ei olnud otstarbekas analüüsiks ette valmistada 15 g proovi, seetõttu kasutati mõningatel juhtudel QuEChERS meetodil proovi ettevalmistamist vähendatud kogustega. Sellisel juhul kasutati proovi ja reagente 3 korda väiksemates kogustes.

Tabel 2. Pestitsiidid (number ja nimi), nende molekulmassid ja meetodi koostamise käigus leitud andmed: pestitsiidi ioniseerimiseks sobiv ioonallikas, eellasiooni m/z väärtused, kvantiseerimise (kvant) ja identifitseerimise (ident) fragmentioonide m/z väärtused, optimeerimise teel leitud fragmenteerimise amplituud (ampl), pestitsiidi retentsiooni aeg (t_R) ning pestitsiidi analüüsime aja-akna piirid.

nr.	pestitsiidi nimi	M [g/mol]	ioon- allikas	eellas- ioon	fragmendid (MS^2)		ampl [V]	t_R [min]	aja-aken [min]
					kvant	ident			
1	pümetrosiin	217,2	ESI	218	105	199	0,40	3,9	0-6,2
2	propamokarb	188,3	ESI	189	144	102; 171	1,08	4,4	0-6,2
3	oksamüül	219,3	ESI	242*	72	121; 185	0,66	5,5	0-6,2
4	karbendasiim	191,2	ESI	192	160	—	0,54	6,6	6,2-8,0
5	metomüül	162,2	ESI	185*	128	143;157	0,71	6,9	6,2-8,0
6	tiametoksaam	291,7	ESI	314*	210	241; 245	0,70	7,4	6,2-8,0
7	tiabendasool	201,2	ESI	202	175	108	0,53	8,6	8,0-9,5
8	imidaklopriid	255,7	ESI	278*	231	235	0,93	10,4	9,5-12,0
9	vamidotioon	287,3	ESI	310*	146	118; 282	0,79	12,7	12-16,7
10	atseetamipriid	222,7	ESI	223	126	187	0,51	13,6	12-16,7
11	kloridasoon	221,7	ESI	222	104	94; 193	0,47	14,4	12-16,7
12	aldikarb	190,3	ESI	213*	116	98; 89	0,37	19,4	16,7-21,0
13	triasulfuroon	401,8	ESI	402	167	333; 141	0,31	22,9	21-26,5
14	metribusiin	214,3	ESI	215	187	145; 84	0,50	23,2	21-26,5
15	imasaliil	297,2	ESI	297	255	201; 159	0,63	24,9	21-26,5
16	fenpropimorf	303,5	ESI	304	130	147; 235	0,71	28,1	26,5-28,9
17	spiroksamiin	297,5	ESI	298	144	100	0,70	29,8	28,9-32,7
18	asoksüstrobiin	403,4	ESI	404	372	335	1,32	31,4	28,9-32,7
19	paklobutrasool	293,8	ESI	294	207	165; 225	0,48	34,7	32,7-37,5
20	müklobutaniil	288,8	ESI	289	220	125	0,75	36,6	32,7-37,5
21	triasofoss	313,3	ESI	314	162	286	1,03	38,5	37,5-39,1
22	mepanipüriim	223,3	ESI	224	183	131; 209	0,41	39,2	37,5-40,7 ^q
23	flukinkonasool	376,2	ESI	376	349	307; 239	0,97	39,5	37,5-40,7 ^q
24	fenheksamiid	302,2	ESI	302	97	142; 283	0,83	39,9	39,1-40,7
25	tetrakonasool	372,2	ESI	372	159	355; 339	0,66	41,5	40,7-44,8
26	epoksikonasool	329,8	ESI	330	123	121; 311	0,79	43,1	40,7-44,8
27	flusilasool	315,4	ESI	316	187	169; 165	0,87	46,2	44,8-47,3
28	benalaksüül	325,4	ESI	326	294	266; 148	0,60	50	47,3-51,5
29	pürasofoss	373,4	ESI	374	346	222; 238	0,72	52,4	51,5-53,6
30	heksütiasoks ^x	352,9	ESI	375*	250	—	0,88	52,5	51,5-53,6
31	buprofesiin	305,4	ESI	306	201	116	0,52	55,2	53,6-63
32	pirimifoss-etüül	333,4	ESI	334	198	182; 306	0,85	55,9	53,6-63
33	kinoksüfeen	308,1	ESI	308	272	197; 289	0,63	56,9	53,6-63
34	püridaat ^x	378,9	ESI	401*	373	—	1,00	—	—

Tabel 2 jätkub järgmisel lehel.

Tabel 2. jätkub

nr.	pestitsiidi nimi	M [g/mol]	ioon- allikas	eellas- ioon	fragmendid (MS ²)		ampl [V]	t _R [min]	aja-aken [min]
					kvant	ident			
35	diklofop- metüül	341,2	APCI	281	120	—	0,57	—	—
36	etofeenproks	376,5	APCI	359	189	—	1,11	—	—
37	etofumesaat	286,3	APCI	286	307	—	0,53	—	—
38	kaptafool	349,1	APCI	314	278	276; 286	0,57	—	—
39	metiokarb	225,3	APCI	169	121	—	0,68	—	—
40	permetriin	391,3	APCI	355	319	255; 279	0,57	—	—
41	tiaklopriid	252,7	APCI	253	124	226; 181	0,36	—	—
42	trifluraliin	335,3	APCI	336	236	232; 278	0,70	—	—
43	vinklosoliin	286,1	APCI	286	342	—	0,57	—	—
44	bifentriin	422,9	—	—	—	—	—	—	—
45	binapakrüül	322,3	—	—	—	—	—	—	—
46	dinoseb	240,2	—	—	—	—	—	—	—
47	endosulfaan- sulfaat	422,9	—	—	—	—	—	—	—
48	etüül-paratioon	291,3	—	—	—	—	—	—	—
49	tetradifoon	356,1	—	—	—	—	—	—	—

^x - Meetodi käigus saadud signaal väga mürane või puudub.

^{*} - Naatriumi aduktioon [M+Na]⁺, kõik teised ESI-s tekkinud eellasioonid on kvaasimolekulaarioonid [M+H]⁺.

^q - pestitsiidi skaneerib massispektromeeter kahes järjestikuses aja-aknas.

3.6. Lahused

Pestitsiidide emalahused valmistati standardainetest kaalumise teel solvendis (MeCN) (ca 450-1700 mg/kg) ning säilitati –20 °C juures. Emalahustest valmistati kaalumise teel pestitsiidide segulahuseid, mida säilitati samuti –20 °C juures. Töolahused valmistati segulahustest puhtas solvendis või maatriksi ekstraktis kaalumise teel. Maatriksi ekstrakt saadi proovi ettevalmistamisel QuEChERS meetodil, kus kasutati kohalikust kauplusest pärit tomatit ning pädevuskatsete korral kasutati pestitsiidivaba viinamarjade homogenisaati.

3.7. Arvutused

Maatriksefekti (%ME), saagise (%S) ja protsessiefektiivsuse (%PE) [13] arvutamisteks kasutati järgnevaid valemeid:

$$\%ME_{tõusust} = \frac{a_{maatriks}}{a_{MeCN}}, \quad (2a)$$

$$\%ME = \frac{C_{\text{leitud, analüüt lisatud pärast ekstraheerimist}}}{C_{\text{analüüt lisatud pärast ekstraheerimist}}} \times 100\%, \quad (2b)$$

$$\%S = \frac{C_{\text{leitud, analüüt lisatud enne ekstraheerimist}}}{C_{\text{leitud, analüüt lisatud pärast ekstraheerimist}}} \times 100\%, \quad (3)$$

$$\%PE = \frac{C_{\text{leitud, analüüt lisatud enne ekstraheerimist}}}{C_{\text{analüüt lisatud proovi enne ekstraheerimist}}} \times 100\% = \%ME \times \%S. \quad (4)$$

$C_{\text{leitud, analüüt lisatud pärast ekstraheerimist}}$ on kalibreerimisgraafiku põhjal leitud analüüdi kontsentratsioon proovis, mida rikastati pestitsiididega pärast proovi ettevalmistamist. $C_{\text{analüüt lisatud pärast ekstraheerimist}}$ on kaalumise teel leitud analüüdi kontsentratsioon proovis, kuhu analüüti lisati pärast proovi ettevalmistamist. $C_{\text{leitud, analüüt lisatud enne ekstraheerimist}}$ on kalibreerimisgraafiku põhjal leitud analüüdi kontsentratsioon proovis, mida rikastati pestitsiididega enne proovi ettevalmistamist. $C_{\text{analüüt lisatud enne ekstraheerimist}}$ on analüüdi kontsentratsioon proovi ettevalmistuse eelselt rikastatud proovis, mis on leitud kaalumise teel. Maatriksefeki leidmisel tõusude meetodil ($\%ME_{\text{tõusust}}$) on a_{maatriks} maatriksvastava kalibreerimisgraafiku tõus ja a_{MeCN} on solvendis valmistatud kalibreerimisgraafiku tõus.

Tõesuste kirjeldamiseks (joonistel 2-4) leiti usaldusvahemikud usaldusnivool 95% vastavalt valemile:

$$\bar{X} \pm t_{n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

kus \bar{X} on parameetri aritmeetiline keskmine, n on mõõtmiste arv, s on standardhälve ning koefitsient t -statistiku väärtus vabadusastmete arvu $n-1$ korral usaldusnivool 95%. Kuna antud mõõtmised viidi läbi 5 korduses, siis t väärtuseks on 2,57. [20]

Avastamispiiri (LoD) ja määramispiiri (LoQ) leidmiseks kasutati järgmisi valemeid:

$$LoD = 3 \times s, \quad (6)$$

$$LoQ = 10 \times s, \quad (7)$$

kus s on madala sisaldusega proovi 7 kordsel analüüsimisel saadud kontsentratsioonide standardhälve. [19]

Pädevuskatsete korraldajad hindasid laborite sooritusi z - ja ζ -skooridega:

$$z = \frac{X_{\text{lab}} - X_{\text{ref}}}{\sigma}, \quad (8)$$

$$\zeta = \frac{X_{\text{lab}} - X_{\text{ref}}}{\sqrt{u_{\text{ref}}^2 + u_{\text{lab}}^2}}, \quad (9)$$

kus X_{lab} on labori mõõtetulemus, X_{ref} on ekspertlaborite poolt määratud referentsväärtus, u_{lab} on labori standardmääramatus, u_{ref} on referentsväärtuse standardmääramatus ning σ on pädevuskatsete korraldajate poolt määratud maksimaalne aktsepteeritav standardmääramatus, mis oli antud juhul 25% referentsväärtusest. [21]

4. TULEMUSED

4.1. Pestitsiidide ioniseerumine ja MS² parameetrite optimeerimine

Pestitsiidide ioniseerumise ja MS analüüsi võimalikkuse uurimiseks kasutati instrumendi tootja soovituslikke parameetreid. Uuritava pestitsiidi lahust (ca 1 mg/kg) lahustis infuseeriti otse massispektromeetri ESI allikasse kasutades infuseerimispumpa. ESI allikat kasutades õnnestus ioniseerida 34 pestitsiidi, millest enamik olid $[M+H]^+$ ioonid, kuid 8 pestitsiidi esinesid naatrium aduktioonina. Uuriti ka ESI-s mitteioniseeruvate pestitsiidide (15 tk) ioniseerumist APCI ioonallika abil. Selgus, et APCI-ga oli võimalik täiendavalt ioniseerida 9 pestitsiidi. Infuseerimise käigus tuvastatud ESI-ga ja APCI-ga ioniseeruvate pestitsiidide m/z väärtused on toodud tabelis 2.

Meetodi selektiivsuse tõstmiseks fragmenteeriti (MS² režiim) ESI käigus tekkinud molekulaar- või aduktioone. Iga pestitsiidi tulemuse hilisemaks kvantiseerimiseks valiti välja kõige intensiivsema signaaliga fragmentioon. Valitud iooni jaoks optimeeriti fragmenteerimispinge amplituut. Pestitsiidide fragmentioonide m/z väärtused ja optimeeritud fragmenteerimispinge amplituudid on toodud tabelis 2.

Edaspidi kasutati iga pestitsiidi määramiseks molekulaariooni (või aduktiooni) fragmenteerimist optimeeritud fragmenteerimispinge amplituudil ning tuvastamiseks ja kvantiseerimiseks tabelis 2 toodud fragmenti.

4.2. Gradiendi optimeerimine

Pestitsiidide kromatograafilise lahutuse saavutamiseks optimeeriti elueerimise gradientprogramm. Gradientprogrammi optimeerimisel peeti silmas nii analüütide kromatograafilist lahutust kui ka analüüsi kiirust. Analüütide lahutus on vajalik, kuna samaaegselt elueeruvad analüüdid võivad elektropihustuse ajal konkureerida ESI tilga pinna pärast ning seetõttu üksteise signaali maha suruda [8]. Samas ei suuda ka ioonlõks analüüte efektiivselt detekteerida MS² režiimis, kui tuleb analüüsida väga palju ioone samaaegselt [22].

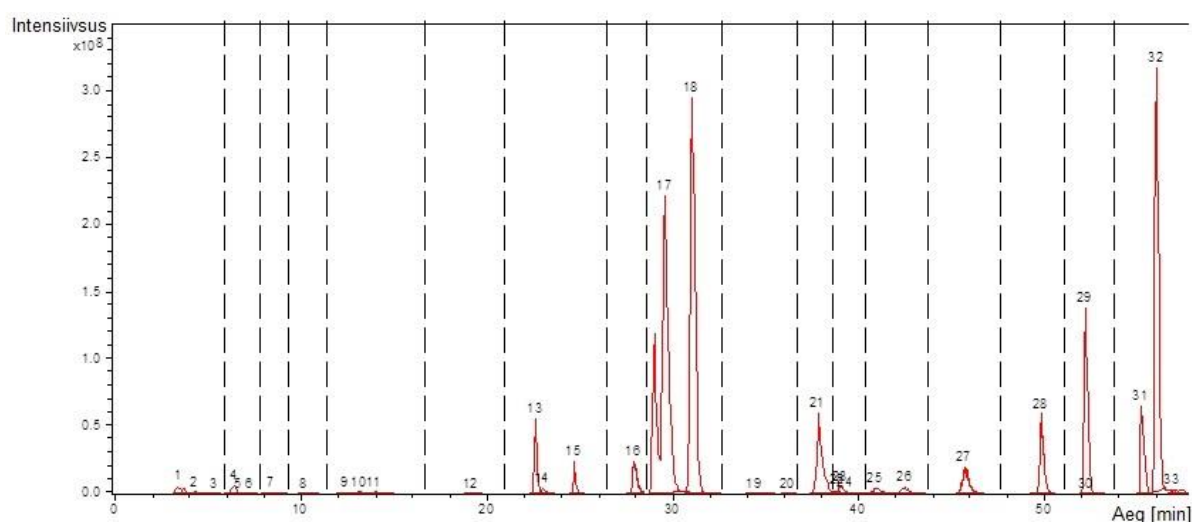
Optimaalse gradiendi leidmisel lähtuti esmasest gradiendist, kus metanooli sisaldus viidi lineaarselt 20%-lt 100%-ni 30 minutiga, sellele järgnes 5 minutiline elueerimine 100% metanooliga pärast mida viidi 5 minutiga metanooli sisaldus tagasi 20%-ni (mobiilfaasi voolukiirus oli 0,8 ml/min). Antud gradienti kasutades leiti iga pestitsiidi retentsiooni aeg. Selleks seadistati massispektromeeter iga kromatograafilise analüüsi jooksul tuvastama korraga maksimaalselt kolme pestitsiidi MS² režiimis. Algse gradiendiga saadud pestitsiidide retentsiooniaegade põhjal sai otsustada kus gradiendi kiirust suurendada (kui analüütide piigid elueeruvad kolonnist suurte ajavahemike tagant) või vähendada (kui analüütide piigid

elueeruvad samaaegselt või väga tihedalt). Seejärel korrati ülalkirjeldatud etappe muudetud gradiendi jaoks. Sellisel viisil muudeti gradienti, kuni saavutati piisav kromatograafiline lahutus. Kokku testiti kümnekonda erinevat gradientelueerimise režiimi. Optimeeritud gradient on toodud tabelis 1.

Kromatograafia optimeerimise käigus leiti, et püridaadi ja heksoksütiasoksi signaalid olid liiga mürased, mistõttu jäeti need pestitsiidid edasise meetodist välja.

4.3. Massispektrometriline meetod

Optimaalse gradiendiga kromatograafilisel eraldamisel saadud retentsiooniaegade põhjal seadistati massispektromeeter MS² režiimis pestitsiide tuvastama gruppide kaupa. Tekitati aja-aknad, milles massispektromeeter analüüsis maksimaalselt kolme erinevat pestitsiidi korraga. Antud aja-akna kestuse jooksul püüab ionilõks kindla m/z väärtusega eellasioone ning kasutab nende fragmenteerimiseks eelnevalt optimeeritud fragmenteerimispinge amplituuti.



Joonis 1. Pestitsiidianalüüsi näidis-kromatogramm kontsentratsioonil ca 1 mg/kg. Pestitsiidide eraldamiseks kasutati optimeeritud gradienti ning fragmenteerimisamplituute. Püstised katkendlikud jooned tähistavad aja-akende piire, numbrid piikide kohal näitavad, millisele pestitsiidile piik kuulub (tabel 2).

Sellisel on võimalik analüüsida kõiki (ESI käigus signaali andvaid) pestitsiide ühe kromatograafilise eraldamise jooksul. Igapäevaselt on siiski enne analüüside teostamist vaja aja-akende piire korrigeerida, kuna mõned aja-aknad on väga kitsad ja erinevatel päevadel pestitsiidide retentsiooniajad mingil määral nihkuvad. Aja-akende ligikaudsed piirid on toodud tabelis 2 ning on näha kromatogrammilt joonisel 1.

4.4. Valideerimine

Meetodi valideerimisel lähtuti SANCO [15] juhendist. SANCO dokumendis on toodud juhised ja nõudmised laboritele, mis tegelevad Euroopa Liidus ametlikult pestitsiidijääkide määramisega toidus ja söödas. SANCO dokumendis pole kõigi valideerimisparameetrite leidmiseks toodud täpseid menetlusi, seetõttu kasutati LoD ja LoQ määramiseks täiendavalt Rahvusvahelise Analüüsikeemikute Ametliku Assotsiatsiooni (AOAC) [19] valideerimise juhiseid.

Valideerimise parameetrid on leitud järjekorras: lineaarne ala, korduvus, tõesus (maatriksefekt, saagis, protsessiefektiivsus), määramis- ja avastamispiir. Sarnast toimingute järjestust on soovitanud ka valideerimisjuhised [18]. Pädevuskatsetel osalemine toimus enne määramis- ja avastamispiiride leidmist.

Valideerimise tulemused on toodud tabelis 3.

4.4.1. Lineaarne ala

Valideerimise käigus määrati lineaarne ala nii solvendis kui ka proovimaatriksis. Mõlemal juhul valmistati pestitsiidide lahused (12 tk) laia kontsentratsiooni vahemikuga (umbes 0,5 µg/kg kuni 5 mg/kg). Saadud kromatograafiliste signaalide põhjal koostati graafikud (teljestikus piigi pindala vs kontsentratsioon) ning lineaarsete alade ulatusi hinnati visuaalselt ja jääkliikmete analüüsiga. Leitud lineaarsed alad jäid erinevatesse kontsentratsioonide vahemikkudesse, keskmiselt algas lineaarne ala kontsentratsioonilt 0,045 mg/kg ja lõppes kontsentratsioonil 1,5 mg/kg. Pestitsiidide lineaarsed alad solvendis ja maatriksis on toodud tabelis 3.

4.4.2. Korduvus

Instrumendi ning kalibreerimislahuste ettevalmistamise korduvuse hindamiseks tomatimaatriksis kasutati 5 proovi. Iga proovi rikastati eraldiseisvalt sama pestitsiidide kogusega pärast proovi ettevalmistamist QuEChERS meetodil.

Proovide ettevalmistamise korduvusi määrati tomati proovidest, mille segu rikastati ja homogeniseeriti enne proovi ettevalmistamist. Mõõtmisteks võetud 5 kordusproovi valmistati igaüks eraldi QuEChERS meetodil. Selliselt määratud korduvus võtab arvesse nii proovi ettevalmistamise kui ka analüüsi korduvust.

Erinevate pestitsiidide suhteliste standardhävete (RSD) väärtusteks saadi keskmiselt 8%. Korduvused on toodud suhteliste standarddärhálvetena tabelis 3.

Tabel 3. Valideerimise käigus leitud parameetrid: maatriksefekt tõusude järgi (%ME tõus), maatriksefekt (%ME), proovi ettevalmistamise saagis (%S), protsessieffektiivsus (%PE). Korduvused on esitatud suhteliste standardhälvetena (RSD), kus ühel juhul on arvestatud lahuste valmistamist lahjendamise teel ja instrumendi korduvust (instrumentaalne), teisel juhul lisandub veel proovi ettevalmistamise (ettevalmistus) korduvus. Tomatimaatriksiga ja puhta solvendiga saadud avastamispiir (LoD), määramispiir (LoQ), lineaarne ala ning Euroopa Liidus maksimaalne lubatud piirmäär (MRL [23]) tomatites. Kontsentratsioonid (c), lineaarse ala ulatus ja MRL on esitatud ühikutes mg/kg.

nr.	pestitsiidi nimi	%ME tõus	%ME	%S	%PE	c	ettevalmistus		instrumentaalne		tomat			MeCN		lineaarne ala	
							RSD	c	RSD	c	MRL	LoD	LoQ	LoD	LoQ	MeCN	tomat
1	pümetroosiin	81%	100%	79%	75%	0,89	5%	0,69	6%	0,88	0,5	0,015	0,050	0,017	0,055	0,01...0,6	0,03...3
2	propamokarb	94%	105%	80%	81%	0,49	6%	0,41	7%	0,52	10	0,0065	0,022	0,012	0,040	0,01...0,7	0,002...0,7
3	oksamüül	76%	103%	86%	85%	0,85	21%	0,74	22%	0,87	0,02	0,34	1,1	0,41	1,4	0,3...7	0,4...2,5
4	karbendasim	102%	93%	79%	70%	0,79	5%	0,57	10%	0,73	0,3 ⁺	0,028	0,092	0,040	0,13	0,04...0,9	0,04...1
5	metomüül	115%	91%	107%	93%	0,57	16%	0,55	10%	0,51	0,02 ⁺	0,053	0,18	0,11	0,37	0,07...2	0,05...5
6	tiametoksaam	93%	105%	86%	85%	0,76	9%	0,66	16%	0,79	0,2	0,098	0,33	0,089	0,30	0,04...2	0,04...2
7	tiabendasool	107%	100%	88%	84%	0,53	8%	0,46	11%	0,53	0,05	0,010	0,034	0,0055	0,018	0,007...0,7	0,03...0,5
8	imidakloprid	110%	104%	94%	94%	0,77	11%	0,75	11%	0,80	0,5	0,14	0,46	0,18	0,59	0,3...5	0,2...2
9	vamidotioon	130%	109%	87%	91%	0,69	4%	0,64	3%	0,74	K	0,041	0,14	0,083	0,28	0,05...2	0,03...6
10	atsetamipriid	81%	101%	90%	87%	0,69	4%	0,62	5%	0,70	0,2	0,016	0,052	0,0081	0,027	0,004...0,8	0,03...2
11	kloridasoon	109%	108%	88%	91%	0,81	6%	0,76	8%	0,87	0,5	0,018	0,062	0,011	0,036	0,01...1	0,04...0,9
12	aldikarb	113%	106%	88%	89%	0,60	3%	0,55	15%	0,63	0,02 ⁺	0,19	0,65	0,17	0,57	0,2...0,7	0,3...2
13	triasulfuroon	110%	107%	89%	91%	0,84	6%	0,79	8%	0,90	0,05	0,011	0,037	0,00056	0,0019	0,001...3	0,03...3
14	metribusiin	104%	106%	82%	84%	0,72	7%	0,63	3%	0,76	0,1	0,020	0,066	0,082	0,27	0,09...0,9	0,03...0,8
15	imasaliil	119%	110%	82%	86%	0,46	4%	0,40	9%	0,50	0,5	0,0022	0,0074	0,0018	0,0060	0,002...1	0,002...0,5
16	fenpropimorf	107%	109%	85%	90%	0,69	6%	0,63	6%	0,74	0,05	0,0011	0,0038	0,00022	0,00075	0,0006...0,8	0,003...0,7
17	spiroksamiin	95%	105%	86%	87%	0,99	2%	0,89	5%	1,04	0,05	0,00040	0,0013	0,00078	0,0026	0,001...1	0,0008...2
18	asoksüstrobiin	106%	105%	87%	88%	0,70	8%	0,64	3%	0,73	3	0,00082	0,0027	0,00041	0,0014	0,0007...0,9	0,0006...0,8
19	paklobutrasool	72%	107%	77%	80%	0,35	7%	0,29	9%	0,37	0,02	0,058	0,19	0,085	0,28	0,03...0,3	0,08...1
20	müklobutaniil	97%	96%	83%	76%	0,78	5%	0,61	11%	0,74	0,3	—	—	0,37	1,2	0,1...1	0,03...1

Tabel 3 jätkub järgmisel lehel.

Tabel 3. jätkub

nr.	pestitsiidi nimi	%ME tõus	%ME	%S	%PE	c	ette- valmistus		instru- mentaalne		tomat			MeCN		lineaarne ala	
							RSD	c	RSD	c	MRL	LoD	LoQ	LoD	LoQ	MeCN	tomat
21	triasofoss	103%	95%	82%	73%	0,92	27%	0,69	14%	0,87	0,01	0,0040	0,013	0,0043	0,014	0,005...1	0,004...1
22	mepanipüriim	119%	119%	70%	79%	0,74	19%	0,60	11%	0,87	1	0,011	0,036	0,0028	0,0094	0,004...1	0,03...0,8
23	flukinkonasool	105%	104%	80%	80%	0,79	4%	0,65	7%	0,82	0,05	0,016	0,054	0,0058	0,019	0,004...1	0,03...1
24	fenheksamiid	122%	95%	91%	82%	0,78	6%	0,65	10%	0,73	1	0,0068	0,023	0,011	0,038	0,01...2	0,003...0,8
25	tetrakonasool	106%	109%	81%	84%	0,92	3%	0,80	5%	0,99	0,1	0,017	0,057	0,0046	0,015	0,005...1	0,04...1
26	epoksikonasool	113%	100%	82%	78%	0,65	6%	0,52	9%	0,65	0,05	0,026	0,087	0,012	0,041	0,003...1	0,06...0,7
27	flusilasool	128%	104%	83%	84%	0,85	4%	0,73	3%	0,88	0,02	0,0016	0,0053	0,0042	0,014	0,004...2	0,004...0,9
28	benalaksüül	100%	111%	74%	79%	0,70	8%	0,57	12%	0,77	0,5 ⁺	0,0036	0,012	0,0058	0,019	0,004...2	0,003...2
29	pürasofoss	107%	105%	88%	89%	0,83	4%	0,76	4%	0,86	0,05	0,00062	0,0021	0,00092	0,0031	0,0008...2	0,0007...3
30	heksütiasoks	—	141%	85%	113%	0,92	—	—	—	—	0,5	—	—	—	—	—	—
31	buprofesiin	108%	106%	74%	75%	0,82	7%	0,63	14%	0,86	1	0,069	0,23	0,0071	0,024	0,04...2	0,04...0,9
32	pirimifoss- etüül	108%	106%	81%	83%	0,88	4%	0,75	4%	0,93	K	0,0012	0,004	0,00092	0,0031	0,0008...1	0,0007...1
33	kinoksüfeen	106%	87%	91%	75%	0,84	15%	0,65	18%	0,73	0,02	0,035	0,12	0,013	0,043	0,01...1	0,04...0,9

K - antud pestitsiid on Euroopa Liidus keelatud.

⁺ - antud maksimaalne piirnorm kehtib antud pestitsiidile summeeritult koos teiste ühenditega: karbendasiim summeeritult koos benomüüluga väljendatult karbendasiimina, metomüül summeeritult koos tiodikarbiga väljendatult metomüülina, aldikarb summeeritult koos vastava sulfoksiidi ja sulfooniga väljendatult aldikarbina ning benalaksüül summeeritult vastavate isomeeridega.

4.4.3. Maatriksefekt, saagis ja protsessiefektiivsus

Maatriksefekti, saagise ja protsessiefektiivsuse hindamisel teostati tomatimaatriksiga proovi ettevalmistus selliselt, et ühel juhul rikastati homogeniseeritud tomatit kindla pestitsiidide kogusega enne proovi ettevalmistust, teisel juhul rikastati pärast proovi ettevalmistust. Antud parameetrite hindamiseks teostati 5 kordust. Kalibreerimislahused vahemikus ca 0,1 kuni 1 mg/kg valmistati solvendis.

Saadud tulemused on toodud tabelis 3 ja joonistel 2-4. Maatriksefekti väärtused olid sõltuvalt pestitsiidist 87 kuni 119%, saagised 70 kuni 107% ja protsessiefektiivsused 70 kuni 94%.

4.4.4. Määramis- ja avastamispiir

LoD ja LoQ määrati nii solvendis kui ka tomatimaatriksis. Selleks valmistati kalibreerimislahused ja proovilahus lineaarse ala alumises osas. Kalibreerimislahused koostati selliselt, et nende kontsentratsioonid jäid umbes kontsentratsioonide vahemikku 2 kuni 30 korda lineaarse ala madalaimast kontsentratsioonist. Proovilahuseks oli lineaarse ala madalaimast kontsentratsioonist ca 3 korda kontsentreeritud proov. Tulemuste arvutamiseks kasutati valemeid 6 ja 7 ning tulemused on toodud tabelis 3. LoD varieerus sõltuvalt pestitsiidist ja maatriksist (solvent või tomati ekstrakt) vahemikus 0,22 µg/kg kuni 0,41 mg/kg, LoQ 0,75 µg/kg kuni 1,4 mg/kg.

4.5. Pädevuskatsed IMEP-37

Meetodi täpsus hinnati täiendavalt IMEP-37 pädevuskatsetes osalemisega. IMEP on Rahvusvaheline Laboritevaheline Võrdlusmõõtmiste Programm ning antud juhul oli tegemist pädevuskatsega, kus määrati 20 erineva pestitsiidi jääke (asoksüstrobiin, karbendasiim, kloropüriifoss, tsüprodiniil, difenokonasool, fenheksamiid, fludioksoniil, imidaklopriid, indoksakarb, iprodioon, metüülkresoksiim, lambdatsühalotriin, metoksüfenosiid, müklobutaniil, penkonasool, püraklostrobiin, pürimetaniil, kinoksüfeen, tebukonasool ja triadimenool) viinamarjadest. Korraldajate eesmärgiks oli jälgida ja hinnata laborite sooritust pestitsiidide jääkide tuvastamisel ja kvantiseerimisel taimsest toidust. [21]

Pädevuskatseid organiseeris Euroopa Komisjoni Teadusuuringute Ühiskeskuse Referentsmaterjalide ja Mõõtmiste Instituut koostöös Euroopa Liidu Puu- ja Kõõgiviljades Pestitsiidide Jääkide Määramise Referentslaboriga. [21]

Pädevuskatsetes osalejatele jagati umbes 220 g proovimaterjali ja ligikaudu sama suur kogus pestitsiidide vaba maatriksit. Antud materjalidega tuli sooritada 2 või 3 sõltumatut

mõõtmist ning edastada korraldajatele tulemuste keskmine koos laiendmääramatuse ja katteteguriga. [21]

Pädevuskatsete käigus analüüsiti 6 pestitsiidi (karbendasiiim, imidaklopriid, asoksüstrobiin, müklobutaniil, fenheksamiid ja kinoksüfeen), mida eelnevalt väljatöötatud meetodiga oli võimalik määrata. Segulahusest tehti kalibreerimislahused solvendis ja viinamarjadest QuEChERS meetodil valmistatud ekstraktist. Pestitsiidide sisalduse määramiseks tehti kolm paralleelmõõtmist, kusjuures proovi ekstraheerimisel QuEChERS meetodil kasutati vähendatud koguseid. Proovi ettevalmistamise saagiste (tabel 4) leidmiseks lisati pestitsiidivabasse viinamarjade segusse kindel kogus pestitsiide ning seejärel valmistati eraldiseisvalt 3 saagise määramise proovi QuEChERS meetodil vähendatud kogustega. Maatriksefekti määramiseks võrreldi viinamarjaekstraktis ja solvendis valmistatud kalibreerimisgraafikute tõuse (valem 2a).

Kuna proovide kontsentratsioonid olid teadmata saadi esimesel mõõtmisel signaalid kalibreerimisgraafiku alumisse piirkonda, seetõttu valmistati kordusanalüüsil lahjemad kalibreerimislahused, et mõõtetulemused jääksid kalibreerimisgraafiku keskosasse. Teisel mõõtmiskorral uuesti saagist ja maatriksefekti ei määratud. Pestitsiidide sisaldused leiti kasutades maatriksvastavat kalibreerimist. Mõlema mõõtmiskorra tulemused keskmistati ning parandati proovi ettevalmistamise saagistega. Saagistega korrigeerimine oli vajalik, kuna enamiku pestitsiidide proovi ettevalmistamise saagis jäi alla 70%. Sellisel juhul soovitab SANCO tulemuste korrigeerimist saagistega [15]. Algsed tulemused leiti ühikutes mg/kg ekstrakti kohta ning ekstrakti tiheduse abil arvutati tulemus ümber ühikutesse mg/kg viinamarja kohta. Laiendmääramatusna kasutati kõikidel pestitsiididel 50%, katteteguriga $k=2$. Saadud suurused on toodud tabelis 4.

Määramatuse hindamisel lähtuti Euroopa Liidu Pädevuskatsete skeemist, kus on kindlaks tehtud, et üldiselt katab 50% laiendmääramatus multimeetoditega puu- ja köögiviljades pestitsiidide jääke määravate laborite laboritevahelise varieeruvuse [15]. SANCO soovitab sellist määramatust kasutada juhul kui on vaja tegeleda täidesaatvate otsustega [15]. Labor võib ametlikult 50% laiendmääramatust kasutada eeldusel, et on arvutuslikult tõestanud, et mõõtmistulemuste laiendmääramatus on sellest väiksem [15]. Kuna meetodi süstemaatilised (tõesus) ja juhuslikud (korduvus) vead olid suhteliselt väikesed, siis laiendmääramatuse hindamisega ei tegeletud vaid kasutati soovituslikku määramatust.

Pädevuskatsete käigus saadud tulemused koos määramatuste hinnangutega on toodud tabelis 4. Saadud tulemused teiste laborite kontekstis on toodud lisas (lk 46-57).

Tabel 4. Pädevuskatsete andmed, referentsväärtused ning tulemuste hinnangud. X_{lab} on labori mõõtetulemus ja $U_{lab (k=2)}$ on mõõtetulemuse laiendmääramatuse hinnang $k=2$ tasemel. X_{ref} on referentsväärtus ja $U_{ref (k=2)}$ on referentsväärtuse laiendmääramatuse hinnang $k=2$ tasemel. Saagised, koos standardhälvetega ($n=3$), ja maatrikseffektid on määratud pädevuskatsete käigus kasutatud viinamarjamaatriksis.

pestitsiidid	saagis	maatriks- efekt	X_{lab}	$U_{lab \text{ (k=2)}}$	X_{ref}	$U_{ref \text{ (k=2)}}$	z-skoor	ζ-skoor
			[mg/kg viinamari]					
asoksüstrobiin	70±7%	81%	0,084	0,042	0,092	0,027	-0,36	-0,33
fenheksamiid	57±11%	100%	0,21	0,10	0,203	0,053	0,15	0,13
imidaklopriid	—	—	0,16*	0,08	0,266	0,05	-1,59	-2,26
karbendasiim	79±1%	70%	0,081	0,040	0,096	0,017	-0,62	-0,67
kinoksüfeen	54±7%	114%	0,071	0,035	0,060	0,013	0,074	0,059
müklobutaniil	53±7%	87%	0,19	0,10	0,169	0,047	0,50	0,38

* Imidaklopriid tulemust ei ole ainsana saagisega korrigeeritud, kuna saagise määramise katses ei olnud antud pestitsiid tulemus kvantiseeritav.

5. TULEMUSTE ARUTELU

5.1. Pestitsiidide ioniseerumine

ESI pehmest iseloomust tulenevalt, peaks analüüt juba eelnevalt lahuses olema ioniseeritud või võimeline liitma ESI käigus laetud osakest [8]. Enamik käesolevas töös uuritud pestitsiididest on polaarsed ja aluselised, mis tähendab, et need peaksid olema ESI positiivses režiimis hästi analüüsitavad.

ESI käigus tekkisid põhiliselt $[M+H]^+$ tüüpi kvaasimolekulaarioonid, kuid mõningad pestitsiidid (oksamüül, metomüül, tiametoksaam, imidaklopriid, vamidotioon, aldikarb, heksütiasoks ja püridaat, vastavalt pestitsiidid nr 3, 5, 6, 8, 9, 12, 30 ja 34) andsid $[M+Na]^+$ tüüpi aduktioone. Nende pestitsiidide korral ei esinenud $[M+H]^+$ tüüpi ioone üldse või olid aduktioonid tunduvalt intensiivsema signaaliga kui samast ainest tekkinud kvaasimolekulaarioonid.

Edasiste uuringute käigus selgus, et probleemseteks osutusid just aduktioonide detekteerimine fragmentiooni järgi. Näiteks püridaat (nr 34) ja heksoksütiasoks (nr 30), mis otsesel infuseerimisel massispektromeetrisse andsid nõrka signaali, kuid koos kromatograafilise eraldamisega, oli nende signaal väga ebastabiilne või puudus üldse.

Kirjandusest võib leida, et varem on heksütiasoksi ja püridaati ESI-ga määratud kvaasimolekulaarioonide põhjal, kasutades ioone m/z väärtustega vastavalt 353 ja 379, kuid on ka mainitud, et püridaati on väga harva kasutatud pestitsiidide määramise multimeetodites [7]. Siiski tasub tulevikus proovida antud pestitsiide analüüsida kvaasimolekulaariooni järgi. Need kaks pestitsiidi jäeti meetodist välja ning valideerimistulemuste analüüsi neid ei kaasata.

Aduktioone moodustavate pestitsiidide hulgast paistis välja, et enamasti esineb nende struktuuris sulfiid- ja/või karbonüülrühm. Kirjanduses on arvutuskeemiliselt näidatud [24], et naatriumadukte moodustavad ained, mille tõenäolisim struktuur võimaldab naatriumiga komplekseeruda. Komplekseerumine toimub põhiliselt aluselise hapnikuga rühma osalusel. Enamikel nendest pestitsiididest on selline aluseline hapnik karbonüülrühmas.

APCI ioonallikas sobib kirjanduse andmetel ESI-st paremini keskmise polaarsusega analüütidele [8]. Katsete käigus APCI ioonallikas ioniseeruvatel ning ESI-s halvasti või üldse mitteioniseeruvatel pestitsiididel (35-43) ei olnud paljudel juhtudel aluselist lämmastikku, kuhu prooton oleks saanud ESI käigus kergelt liituda ega ka aluselist hapniku, mille abil saaks toimuda komplekseerumine naatriumiooniga.

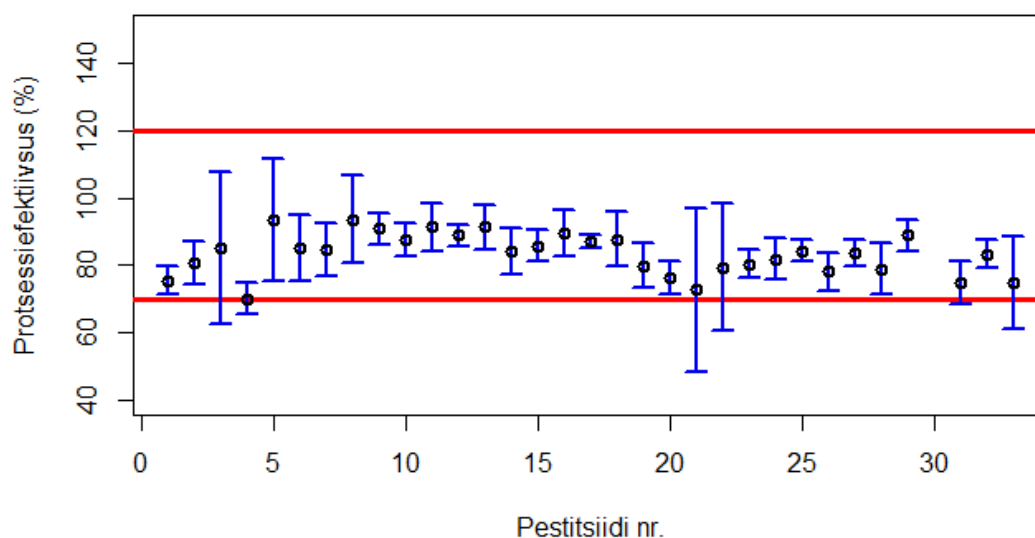
Eraldi tooks välja metiokarbi (nr 39) ja tiaklopriidi (nr 41), mille struktuuridest võiks eeldada, et need ioniseeruvad ESI-ga. Antud pestitsiidid tõepoolest katsete käigus ESI kasutamisel ioniseerusid, kuid tekkinud eellasioonide intensiivsused ei olnud rahuldavad ning ei võimaldanud läbi viia fragmenteerimist. APCI-ga ioniseerusid need pestitsiidid märgatavalt paremini.

Esines ka pestitsiide (44-49), mida polnud võimalik ei ESI ega ka APCI-ga ioniseerida. Nende struktuurist on samuti näha, et neil puudub aluseline piirkond, kuhu positiivselt laetud osake võiks liituda.

5.2. Valideerimistulemuste headus SANCO kriteeriumite alusel

SANCO poolt väljastatud juhis [15] on kogumik kvaliteedikontrolli protseduuridest ning laboritele esitatud nõudmistest. SANCO kriteeriumeid peavad jälgima laborid, mis Euroopa Liidus tegelevad ametlikult pestitsiidijääkide kontrollimisega toidus ja söödas. SANCO nõudmised on esitatud selliselt, et meetodiga oleks võimalik kontrollida pestitsiidi jääkide sisaldusi maksimaalsete piirnormide tasemel, viia läbi täidesaatvaid otsuseid ja hinnata tarbijate kokkupuudet pestitsiididega. Seetõttu on oluline võrrelda saadud valideerimistulemusi SANCO kriteeriumitega.

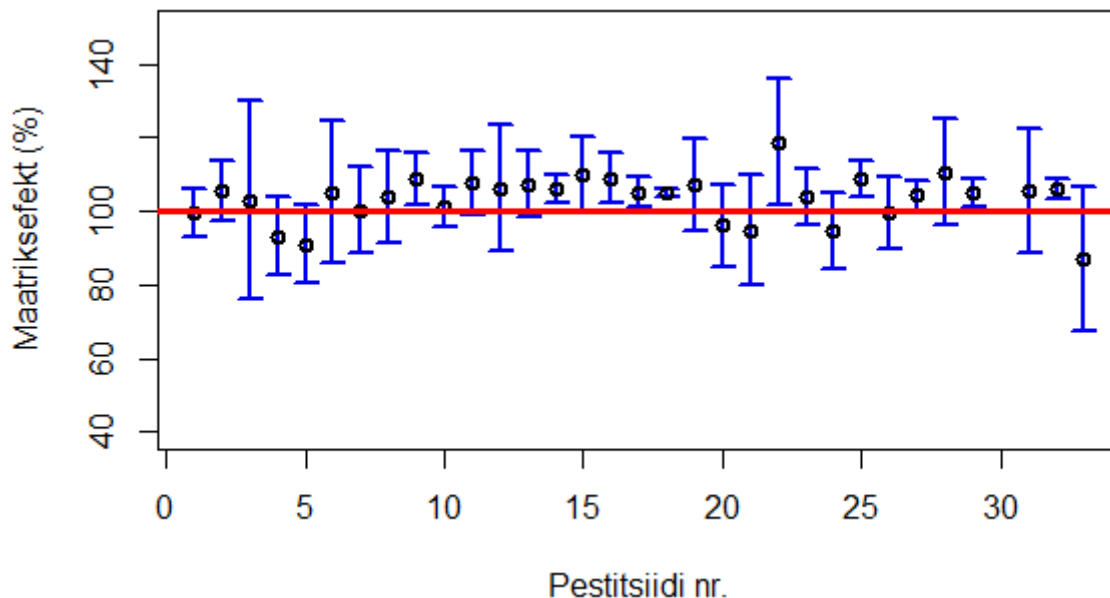
5.2.1. Meetodi tõesus



Joonis 2. Protsessiefektiivsused koos veavälpadega 95%-l usaldusnivool. Punased jooned tähistavad SANCO tõesuse kriteeriume. Y-teljel on toodud protsessiefektiivsus ja x-teljel pestitsiidi number (tabel 3).

SANCO kriteeriumite järgi peaks meetodi tõesus jääma vahemikku 70-120% [15]. LC/ESI/MS meetodi suurimateks tulemuste tõesuse mõjutajateks on proovi ettevalmistamise saagis ja ionisatsiooni maatriksefekt, mida kombineeritult võib väljendada protsessiefektiivsuseks (tabel 3, joonis 2). Antud meetodil saadi tomatimaatriksis keskmiseks

protsessiefektiivsuseks üle kõigi pestitsiidide 83%, kusjuures pestitsiidide keskmised protsessiefektiivsuse väärtused jäid 70% ja 94% vahele. See tähendab, et meetod vastab tõesuse kriteeriumitele isegi juhul, kui maatriksefekt maatriksvastavate kalibreerimislahuste abil arvesse ei võeta.



Joonis 3. Ionisatsiooni maatriksefektid (valemi 2b põhjal) koos veavälpadega 95%-l usaldusnivool. Punane joon tähistab maatriksefekt puudumist. Y-teljel on toodud maatriksefekt ja x-teljel pestitsiidi number (tabel 3).

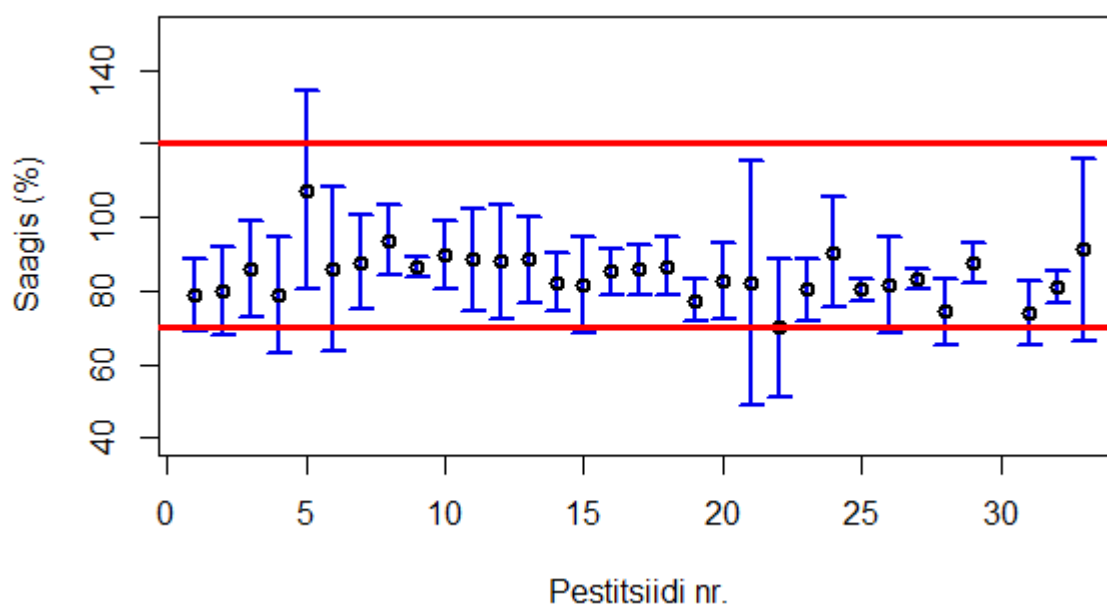
SANCO kohaselt on vaja kontrollida maatriksefekt olemasolu ning soovitatav maatriksefekt arvesse võtmiseks kasutada maatriksvastavaid kalibreerimislahuseid [15]. Katsetest selgus, et ionisatsiooni maatriksefektid (tabel 3, joonis 3) olid antud mõõtmiste juures küllaltki väikesed. See võib olla tingitud suhteliselt laugest elueerimise gradiendist, mis viib tõenäosuse, et analüüdiga samal ajal elueerub maatriksi komponent, küllaltki väikeseks. Kindlatel kontsentratsioonidel määratud maatriksefektid olid keskmiselt 103%. Antud katse puhul olid suurimateks hälbijateks nr 22 mepanipüriim (119%) ja nr 33 kinoksüfeen (87%).

Maatriksefekt on võimalik leida ka solvendis ja maatriksis valmistatud kalibreerimisgraafikute tõusude jagatisest (valem 2a). Selliselt leitud maatriksefektid kattuvad küllaltki hästi kontsentratsioonide kaudu leitud maatriksefektiga (valem 2b). Tõusude kaudu saadud maatriksefektide keskmiseks oli 105%, selliselt määratud maatriksefekt suurimateks hälbijateks oli nr 19 paklobutrasool (72%) ja nr 9 vamidotioon (130%).

Kuna antud arvutused on teostatud lineaarsete alade määramise graafikute põhjal, siis ei pruugi tulemused olla otseselt võrreldavad, kuna lineaarsete alade piirkonnad tomati ekstraktis ja solvendis erinevad mõningal määral. Samuti on tõusude ja kontsentratsioonide kaudu määratud maatriksefektid erinevatel päevadel ja erinevat sorti tomatitega. Kirjanduses on näidatud, et sama vilja eri sortides võib maatriksefekt oluliselt erineda [14]. Antud

tingimused võivad olla ka põhjuseks, miks mõningate pestitsiidide maatriksefektide kahe erineva katse käigus leitud väärtused ei lange hästi kokku.

Maatriksefekti mõlemat tüüpi arvutuste korral võib näha, et üldine tulemuste tendents on kergelt ionisatsiooni võimenduse suunas. See võib olla põhjustatud asjaolust, et solvendi ja maatriksi ekstrakti tihedused on erinevad ($\rho_{\text{MeCN}} = 0,786 \text{ g/ml}$; $\rho_{\text{ekstrakt}} = 0,814 \text{ g/ml}$). Lahuste lahjendused on arvutatud kaalumise teel (kontsentratsioonid on ühikutes $\text{mg/kg}_{\text{lahus}}$). Kromatograafi automaatne proovisisesti süstib kolonni proove aga ruumala järgi ($5\mu\text{l}$). Sellest tuleneb erinevus proovide vahel, mis on valmistatud solvendis ja ekstraheeritud maatriksis. Antud juhul moodustab ekstrakti tihedus puhta solvendi tihedusest 103,6%, mis on kooskõlas keskmise maatriksefekti väärtusega.



Joonis 4. Proovi ettevalmistamise saagised koos veavälpadega 95%-l usaldusnivool. Punased jooned tähistavad SANCO tõesuse kriteeriume. Y-teljel on toodud saagised ja x-teljel pestitsiidi number (tabel 3).

Olenemata väikesest ionisatsiooni maatriksefektist kasutati antud töös selle arvesse võtmiseks maatriksvastavaid kalibreerimislahuseid nagu seda soovib SANCO [15]. Sellisel juhul väljendab meetodi tõesust vaid proovi ettevalmistamise saagis. See tähendab, et maatriksvastavate kalibreerimislahuste kasutamise korral, peavad meetodis uuritavate pestitsiidide proovi ettevalmistamise saagised jääma vahemikku 70-120%. Katsete käigus saadi keskmiselt saagiseks (tabel 3, joonis 4) 84%, kõige suuremateks hälbijateks olid pestitsiidid nr 22 mepanipüriim (70%) ja nr 5 metomüül (107%).

Metomüül (nr 5) oli ka ainsaks pestitsiidiks, mille proovi ettevalmistamise saagis oli suurem, kui 100%. Selline anomaalne tulemus on tõenäoliselt tingitud juhuslikus varieeruvusest – jooniselt 4 on näha, et metomüüli veavälp 95%-usaldusnivool on küllaltki lai.

Proovi ettevalmistamise saagiseid määrati ka pädevuskatsete käigus viinamarjades (tabel 4). Viinamarjade korral saadi keskmiseks saagiseks 63%, tomatis samade pestitsiidide keskmiseks saagiseks oli 87%. Ainsana ekstraheerus võrreldavalt mõlemas maatriksis karbendasiim (nr 4). Asoksüstrobiini (nr 18), müklobutaniili (nr 20), fenheksamiidi (nr 24) ja kinoksüfeeni (nr 33) jaoks saadud keskmised saagised tomatis ja viinamarjas olid (t-testi alusel [20]) statistiliselt oluliselt erinevad. Selle põhjal saab järeldada, et proovi ettevalmistamise saagis oleneb suurel määral viljast, milles pestitsiidi määratakse.

Viinamarjad sisaldavad tomatitest tunduvalt rohkem erinevaid sahhariide [25], sealhulgas suhkruid, mis võivad pestitsiidide ekstraheerumist takistada.

5.2.2. Korduvus

Korduvus, väljendatuna suhtelise standardhālvena, peaks SANCO kriteeriumite järgi olema madalam kui 20%. Määratud korduvused on toodud tabelis 3. Kogu meetodi korduvust kirjeldab kõige paremini proovi ettevalmistuse eelselt analüütidega rikastatud proovide korduvus. Koos proovi ettevalmistusega määratud korduvustest ei täitnud SANCO kriteeriume vaid oksamüül (nr 3) ja triasofoss (nr 21).

Kuna antud korduvusi määrati enne määramispiiride hindamist, siis seetõttu oksamüüli kõrgest määramispiirist tulenevalt on antud pestitsiidi korduvust määratud allpool määramispiiri. Kuna antud kontsentratsioon, ei kuulu meetodi tööpiirkonda, siis sellisel kontsentratsioonil ei peagi korduvuse kriteerium täidetud olema. Ka aldikarbi korduvus oli määratud allpool tema hinnangulist määramispiiri, kuid tema korduvus antud kontsentratsioonil jäi lubatud piiridesse.

Triasofossi (nr 21) suur suhteline standardhālve on tõenäoliselt tingitud olukorrast, et ta elueerub piirkonnas, kus pestitsiidide kromatograafiline lahutus on kõige kehvem. Seetõttu on antud piirkonnas väga kitsad aja-aknad ning mõnel juhul võib juhtuda, et pestitsiidide retentsiooniaegade väikese nihkumise tõttu jääb aja-akna lõppedes kromatograafilise piigi saba registreerimata.

Ka mepanipüriim (nr 22) asub kitsaste aja-akende piirkonnas ning tema korduvus jäi napilt lubatu piiridesse (RSD=19%). Mepanipüriim on üheks pestitsiidiks, mis on kahes aja-aknas korraga. Mepanipüriimi suur suhteline standardhālve on tõenäoliselt tingitud sellest, et aja-akende vahetumise ajal võib tekkida registreeritavas signaalis anomaalsusi. Antud piirkonnas elueeruvate pestitsiidide kromatograafilise lahutuse saavutamiseks on koostatud pikk isokraatilise alaga (22-40 min), mis eelneb nende pestitsiidide elueerumisele. Parema

lahutuse saavutamiseks võib edaspidi proovida gradiendi koostamist teiste solventide ja puhvritega või kasutada teise statsionaarse faasiga kolonni.

Triasofossi ning mepanipüriimi korduvuste parendamiseks võib edaspidi proovida kahe aja-akna ühendamist selliselt, et ühes aknas on neli pestitsiidi (21-24) ning uurida, kas sellistel tingimustel korduvused ja LoQ vastavad SANCO kriteeriumitele. Olukorrale saaks lahenduse leida ka kasutatava instrumendi vahetamise teel. Üheks võimaluseks on saavutada pestitsiidide kromatograafiline lahutus ülikõrgefektiivse vedelikkromatograafiaga [26]. Teiseks variandiks oleks kolmekordse kvadрупooliga massianalüsaatori kasutamineioonlõks massianalüsaatori asemele. Kolmekordse kvadрупooliga massianalüsaatori on kiirem ja võimaldab heal tasemel kvantitatiivselt analüüsida rohkemaid ioone üheaegselt [7].

Korduvused määrati ka ilma proovi ettevalmistamise etapita. See tähendab, et tulemuste omavaheline hälbimine tuleneb lahuste lahjendamisest ja peamiselt instrumentaalsetest aspektidest. Saadud tulemused on võrreldavad proovi ettevalmistamistust arvestava korduvusega. Kuna proovi ettevalmistamine korduvust oluliselt ei suurenda, võib järeldada, et proovi ettevalmistamine QuEChERS meetodil tomatist on küllaltki hästi reprodutseeritav ja põhilise panuse tulemuste korduvustesse annavad LC/MS instrumentaalsed aspektid.

5.2.3. Määramispiir

SANCO kriteeriumite järgi peaks meetodis pestitsiidi määramispiir olema madalam, kui antud pestitsiidi maksimaalne lubatud piirnorm (MRL) antud viljas [15]. See tähendab, et kriteeriumi täidetavus oleneb viljast, milles antud meetodit valideeritakse. Antud töös oli valideerimismatriksiks tomat, milles maksimaalsed lubatud piirnormid [23] on küllaltki madalad (tabel 3). Sellest tulenevalt ei õnnestunud kõigi analüütide jaoks saavutada aktsepteeritavat määramispiiri. SANCO määramispiiride kriteeriumi täitsid 22 pestitsiidi.

Teistest enam paistsid oma kehvemate määramispiiride poolest silma pestitsiidid, mille eellasiooniks oli valitud naatriumi adukioon. Adukioonide põhjal analüüsitud pestitsiididest olid oksamüül (nr 3), metomüül (nr 5), tiametoksaam (nr 6), imidaklopriid (nr 8) ja aldikarb (nr 12) küllaltki kõrgete määramispiiridega. Kehv määramispiir võib olla tingitud asjaolust, et ained ei anna madalatel kontsentratsioonidel signaali ja/või on signaal küllaltki mürane. Kuna antud pestitsiidide korduvused olid head (va metomüül, mille korduvus on määratud allpool määramispiiri), võib järeldada, et adukioonide fragmenteerumise käigus esineb fragmenteerumist mahasuruv efekt, mille tulemusel annavad

aduktioonide fragmentide põhjal analüüsitud pestitsiidide mõistlikku signaali alles küllaltki kõrgetel kontsentratsioonidel.

Kirjanduses [24] on tähendatud naatriumaduktioonide kehva fragmenteerumist, kuid mingit kindlat põhjust selle kohta pole välja toodud. Aduktioonide põhjal analüüsitud pestitsiide võiks parema määramispiiri saamiseks proovida analüüsida $[M+H]^+$ kvaasimolekulaariooni järgi juhul, kui ioniseerumise käigus on selline ioon tuvastatav.

5.3. Pädevuskatsete tulemused

SANCO kohaselt peab pestitsiidide analüüsimisega tegelev labor enda tulemuste tõesust tõestama regulaarselt pädevuskatsete käigus [15]. Alles valideerimise järgus oleval meetodil võimaldab osalemine pädevuskatsetel koheselt hinnata, kuivõrd adekvaatseid mõõtmistulemusi on võimalik meetodiga saada.

Pädevuskatsete käigus saadud tulemuste z- ja ζ-skooride põhjal (tabel 4) võib öelda, et viinamarjades määratud pestitsiidide sisaldused olid piisavalt täpsed. Vaid imidaklopriidi ζ-skoor ei saanud rahuldavat väärtust, kuid z-skoor oli siiski rahuldav – see näitab, et saadud tulemus jäi ekspertlaborite poolt hinnatud referentsväärtuse maksimaalse lubatud $k=2$ tasemel laiendmääramatuse piiridesse, milleks on antud tüüpi mõõtmistel 50%. Imidaklopriidi teistest pestitsiididest halvemad skoorid tuleneb olukorrast, et antud pestitsiidi mõõtetulemust pole ainsana saagisega korrigeeritud, kuna saagise määramise katse käigus ei õnnestunud imidaklopriidi jaoks saada kvantiseeritavaid tulemusi. Imidaklopriid oli antud pestitsiididest ainus, mida analüüsiti aduktiooni põhjal.

Tulemuste saagistega korrigeerimine on viinamarjaproovide puhul vajalik, kuna proovi ettevalmistamise käigus saadud saagised (tabel 4) on enamiku pestitsiidide jaoks küllaltki madalad ning ilma korrigeerimiseta ei vastaks mõõtmiste tõesus SANCO [15] kriteeriumitele.

SANCO kohaselt kuuluvad tomatid kõrge veesisaldusega maatriksite gruppi ning viinamarjad kõrge veesisaldusega happeliste maatriksite gruppi. Kui aga proovi ettevalmistamise käigus on kasutatud puhvrit, siis võib antud grupid lugeda üheks ning nendesse kuuluvate puu- ja köögiviljade maatriksid võiksid käituda sarnaselt. Seetõttu lubab SANCO ühe esindusliku maatriksiga valideeritud meetodit rakendada teiste sarnasesse gruppi kuuluvate viljade/toodete analüüsimiseks ning täiendavad kvaliteedi kontrolli ja valideerimise andmed tuleb omandada edasiste (rutiin-)analüüside käigus. [15]

Antud töös on kasutatud proovi ettevalmistamisel puhverdamiseks sipelghapet ja naatriumatsetaati, seega võiksid katsete tulemused viinamarja- ja tomatimaatriksites olla

sarnased. Katsete käigus saadud tulemuste põhjal selgus, et proovi ettevalmistamisel saadud saagised viinamarjamaatriksis on tunduvalt madalamad kui tomatimaatriksis, see-eest õnnestus viinamarjamaatriksis saada tõeseid tulemusi kontsentratsioonidel, mis tomatimaatriksi puhul jääks allapoole määramispiiri. Tulemustest on näha, et need maatriksid ei käitu sarnaselt samast tootegrupist olenemata.

Imidaklopriidi, kinoksüfeeni ja müklobutaniili referentsväärtused pädevuskatsete proovides (viinamarjamaatriksis) olid madalamad, kui antud pestitsiidide määramispiirid tomatimaatriksis. Hoolimata sellest näitavad saadud tulemused, et tõenäoliselt on võimalik viinamarjamaatriksis saavutada madalamaid määramispiire (ζ -skooride alusel) või tomatimaatriksis leiti määramispiire liiga konservatiivse meetodiga, mis hindas määramispiire pigem suuremaks kui nad tegelikult on.

Pädevuskatsete käigus saadud tulemuste headust saab hinnata ka tulemuste jaotuse põhjal referentsväärtuse suhtes. Pooled tulemused olid referentsväärtusest suuremad ja pooled väiksemad – see näitab tulemuste head statistilist jaotumist referentsväärtuste ümber ning saab öelda, et mõõtetulemused ei hälbi referentsväärtustest ühesuunaliselt.

Saadud ζ -skooride põhjal võib öelda, et mõõtetulemustega esitatud 50%-ne laiendmääramatus ($k=2$) on küllaltki mõistlik, kuna selliselt esitatud tulemus hõlmab enamiku pestitsiidide (välja arvatud imidaklopriid) tulemuste puhul referentsväärtust. Suhteliselt kõrge määramatus tuleneb antud tüüpi analüüsi keerukusest (palju analüüte ja keeruline maatriks), millele viitab ka ekspertlaborite poolt leitud referentsväärtuse suhteliselt kõrge määramatus (tabel 4 ja pädevuskatsete joonised lisas).

Jälgides pädevuskatsete käigus teiste laborite poolt kasutatud instrumente, selgub, et LC ühendatult ioon-lõks massianalüsaatoriga on pestitsiidide analüüsimisel küllaltki vähelevinud. Antud töö tõestab, et ka ioon-lõks võib olla piisavalt võimekas pestitsiidide määramise multimeetodi koostamiseks, kuid siiski pole see võrreldav kolmekordse kvadрупool-massianalüsaatoriga, mis võimaldavad analüüsida sadu pestitsiide korraga [7].

Kokkuvõtvalt võib öelda, et pädevuskatsete tulemustega saab rahule jääda, kuna on saavutatud aktsepteeritavaid tulemusi pestitsiidide kvantitatiivsel määramisel viinamarjadest kontsentratsioonidel, mis on madalamad MRL [23] väärtustest.

5.4. Avastamis- ja määramispiiri võrdlus lineaarse ala algusega

Arvutatud avastuspiiride (LoD, tabel 3) hinnangud on paljudel juhtudel madalamatel kontsentratsioonidel, kui lineaarse ala algus. Kui standardhälbe kaudu arvutatud LoD väärtus on madalam lineaarse ala algusest, siis see näitab, et madalamatel kontsentratsioonidel on signaal küllaltki stabiilne. Vaatamata sellele tuleks käesoleval juhul avastamispiirina käsitleda madalaimat lineaarse ala punkti, kuna arvutusliku LoD väärtuse juures pole piigi olemasolu kontrollitud.

Kui aga leitud lineaarse ala algus paikneb madalamal kontsentratsioonil, kui arvutuslikult leitud LoD, siis see tähendab, et lineaarse ala alguses pole signaalide korduvus piisav ning avastuspiirina tuleks käsitleda arvutuslikult leitud LoD väärtust.

Sellegi poolest on pestitsiidide kvantitatiivseks määramiseks olulisema tähtsusega LoQ hinnangud (tabel 3), mis viitavad meetodi tööpiirkonna algusele. Leitud LoQ hinnangute väärtused on enamiku pestitsiidide puhul lineaarse ala piirkonnas. Vaid buprofeeniil (nr 31) on arvutuslik LoQ väärtus solvendis madalam, kui vastav lineaarse ala algus. Olukord on tõenäoliselt tingitud asjaolust, et lineaarse ala leidmisel olid kalibreerimispunktid suurte kontsentratsioonide vahemikega, mistõttu ei saa leitud lineaarse ala algust ja lõppu väga suure täpsusega defineerida. Paklobutrasoolil (nr 19) ja müklobutaniilil (nr 20) jäi solvendis arvutuslik LoQ väärtus esialgselt leitud lineaarse ala lõppu, mistõttu on antud pestitsiididele vaja leida uus lineaarne ala kõrgematel kontsentratsioonidel.

5.5. Pestitsiidide identifitseerimine

SANCO kohaselt [15] võiks proovis leiduvat pestitsiidi täiendavalt identifitseerida, kui on kahtlus, et pestitsiidi sisaldus ületab maksimaalset lubatud piirnормi või kui proovist leitakse ebatavalisi pestitsiide. Kuigi antud tehnika puhul on analüüdi tuvastamiseks võimalik kasutada retentsiooniga, eellas- ja fragmentiooni m/z väärtusi, siis täiendava võiks analüüdi tuvastamiseks kasutada veel vähemalt ühte fragmentiooni ning jälgida selle intensiivsuste suhet kvantiseerimisiooniga. Antud kriteerium on siiski pigem SANCO poolne suunitlus, kuidas identifitseerida, ning seda ei tuleks võtta absoluutse kriteeriumina. Antud töös pole välja toodud identifitseerimispiikide suhet kvantiseerimisiooniga, kuna suhete korduvus erinevate mõõtmiste käigus ei osutunud paljude ionide korral piisavalt heaks. Identifitseerimiseks sobivate fragmentide m/z väärtused on toodud tabelis 2.

KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärgiks oli koostada multimeetod TÜ Katsekojas pestitsiidide kvantitatiivseks määramiseks puu- ja köögiviljades LC/ESI/MS meetodil ning kontrollida antud meetodi sobilikkust valideerimise teel ja seeläbi suurendada Katsekoja kompetentsi pestitsiidide määramises.

Uuringute käigus selgus, et enamik (34 tk) katsealustest pestitsiididest ioniseerusid ESI ioonallikas. Kõigi ioniseeruvate pestitsiidide jaoks optimeeriti massispektromeetri parameetrid ning leiti sobiv mobiilfaasi gradientprogramm piisava kromatograafilise lahutuse saavutamiseks.

Instrumentaalse meetodi koostamise järel leiti valideerimise käigus meetodi iseloomustamiseks iga pestitsiidi lineaarne ala, määramis- ning avastamispiir, korduvus ja tõesus (protsessiefektiivsus, saagis ja maatriksefekt). Meetod valideeriti tomatimaatriksis, mistõttu on väljatöötatud meetod kasutatav kõrge veesisaldusega puu- ja köögiviljades pestitsiidide määramiseks. Meetodi sobilikkus kinnitati täiendavalt pädevuskatsete käigus.

Koostatud meetod tõestas valideerimise käigus, et vastab 22 pestitsiidi jaoks SANCO kriteeriumitele. Teiste pestitsiidide kriteeriumile vastavust segasid peamiselt aduktioonide põhjal analüüsitud pestitsiidide kehv fragmenteerumine ning sellest tulenevad kõrged määramispiirid võrreldes Euroopa Liidus tomatitele seatud maksimaalsete lubatud piirnormidega.

Meetod tõestas oma tulemuste tõesust Rahvusvahelise Laboritevahelise Võrdlusmõõtmiste Programmi raames, kus saadi aktsepteeritavaid tulemusi viinamarjadest pestitsiidide määramisel kontsentratsioonidel, mis jäid allapoole viinamarjades lubatud maksimaalseid piirnorme.

Töö edasiseks arenguks võiks tulevikus aduktioone moodustavaid pestitsiide analüüsida kvaasimolekulaariooni põhjal, et parandada meetodi määramispiiri nende pestitsiidide jaoks, ning optimeerida kõikide pestitsiidide ioniseerumist mõjutavaid parameetreid. Edaspidi võiks meetodi valideerimiseks kasutada ka teisi vilju, kuna maatriksefekt ja saagis sõltuvad suurel määral analüüsitavast viljast.

Antud meetodit saab tulevikus kasutusele võtta järgnevates teadusuuringutes ning saab kasutada ka erinevates pestitsiidide monitoorimise rakendusuuringutes.

SUMMARY

Development of LC/ESI/MS method for pesticide residues analysis

In modern consumer society the usage of pesticides is inevitable in agriculture and in the food industry. On the other hand exposure to pesticides can cause a wide variety of health problems. Therefore it is important to have sensitive and selective methods for quantitative determination of pesticide residues.

The aim of this work was to complement pesticide residues determination competency of Testing Centre of University of Tartu. Therefore pesticides ionisation was studied using electrospray ionisation (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) sources. The fragmentation amplitude was optimised for pesticides, which ionised in ESI source. Also elution gradient was optimised for chromatographic separation with reversed phase liquid chromatography (LC). Pesticides were grouped into time segments, where the mass spectrometer (MS) analysed simultaneously 3 analytes, according to the retention times. Pesticides were quantified in MS² detection mode by fragment ions.

The instrumental method was validated to inspect methods linear range, precision, trueness (process effectivity, recovery and matrix effect), limit of detection and quantification in tomato matrix. As the method was validated with tomato, it is suitable for determining pesticides from high water content fruits and vegetables. Method suitability for purpose was also confirmed in proficiency test IMEP-37 in grapes.

Validation process revealed that analysing 22 pesticides meets the criteria of European Commission Health and Consumer Protection Directorate-General (SANCO). The main limitation for achieving SANCO criteria for other pesticides was poor fragmentation of sodium adducts. Therefore for these pesticides the low quantification limits, which should be lower than maximum residue limits set by legislation, were not achieved.

The method has proved its accuracy for 6 out of 6 studied pesticides in International Measurement Evaluation Programme: IMEP-37 where the accurate results were obtained in determining concentrations which were below the maximum residue limit in grapes.

To improve methods quantification limit adduct forming pesticides should be tested for analyses via quasi-molecular ion. Also different parameters for improving the ionisation could be optimised. In addition method could be validated by using different fruits and vegetables, because matrix effect and recovery depends on the used matrices.

In future this method can be used in the following scientific researches, also it can be used in the application of monitoring pesticides.

6. KASUTATUD KIRJANDUS

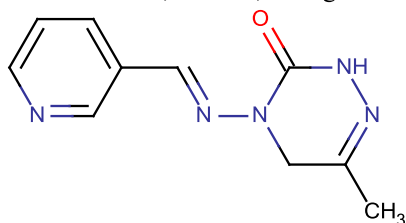
1. M. Stoytcheva, Pesticides - Formulations, Effects, Fate, InTech, Rijeka, 2011, p. 808.
2. M. Stoytcheva, Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis, InTech, Rijeka, 2011, p. 404.
3. K. Ridgway, S. P. Lalljie, R. M. Smith, Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 36.
4. A. Beyer, M. Biziuk, Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chem.* 108 (2008) 669.
5. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
6. L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84.
7. S. J. Lehotay, Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595.
8. R. B. Cole, Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Wiley, Hoboken, 2010, p. 847.
9. N. B. Cech, C. G. Enke, Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362.
10. R. E. Ardrey, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction, Wiley, Huddersfield, 2003, pp. 12-101.
11. E. Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, Wiley, Chichester, 2007, pp. 85-210.
12. W. M. A. Niessen, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, Marcel Dekker, New York, 1999, pp. 7-8.
13. P. J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328.
14. A. Krueve, A. Künnas, K. Herodes, I. Leito, Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chrom. A* 1187 (2008) 58.
15. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 2013.

16. W. Z. Shou, H. Z. Bu, T. Addison, X. Jiang, W. Naidong, Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method for the determination of ribavirin in human plasma and serum. *J. Pharmaceut. Biomed.* 29 (2002) 83.
17. D. B. Hibbert, *Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory*, Oxford University Press, New York, 2007, pp. 227-236.
18. ICH harmonized tripartite guideline: validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
19. AOAC guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals, AOAC International, 2002.
20. J. N. Miller, J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson, Harlow, 2005, pp. 28-45.
21. IMEP-37: Determination of pesticides in grapes, European Commission, DG Joint Research Centre, Institute of Reference Materials and Measurements, 2014.
22. Agilent 1100 series LC/MSD trap operation manual, version 4.2, 2002.
23. EU pesticides database, Directorate General for Health & Consumers. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides viimati uuendatud 18.04.2014.
24. A. Krüve, K. Kaupmees, J. Liigand, M. Oss, I. Leito, Sodium adduct formation efficiency in ESI source. *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 695.
25. National Nutrient Database for Standard Reference, United States Department of Agriculture. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods> viimati alla laetud 24.05.2014.
26. N. Wu, A. M. Clausen, Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1167.

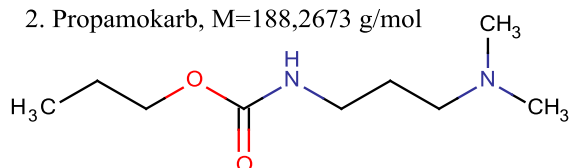
Lisa

Käesolevas töös uuritud pestitsiidide struktuurvalemid

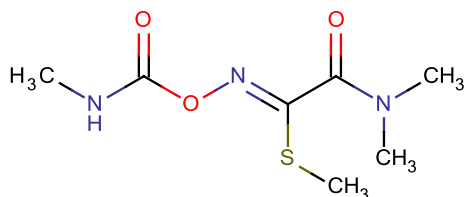
1. Pümetrosiin, $M=217,2272$ g/mol



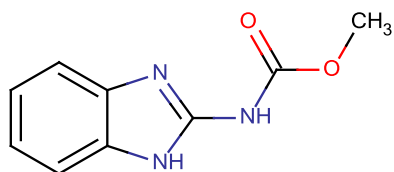
2. Propamokarb, $M=188,2673$ g/mol



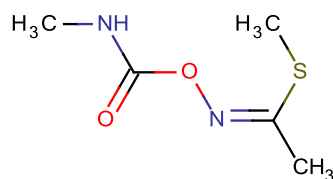
3. Oksamüül, $M=219,261$ g/mol



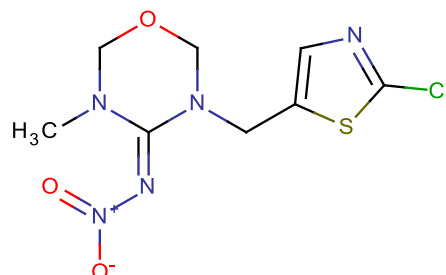
4. Karbendasiim, $M=191,1867$ g/mol



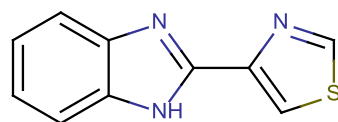
5. Metomüül, $M=162,21$ g/mol



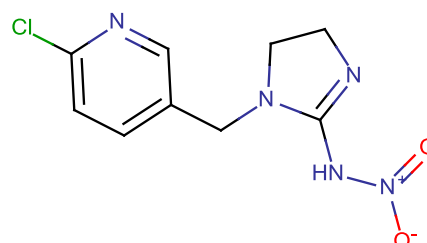
6. Tiametoksaam, $M=291,715$ g/mol



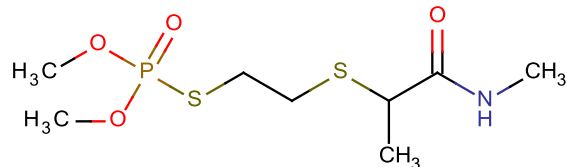
7. Tiabendasool, $M=201,248$ g/mol



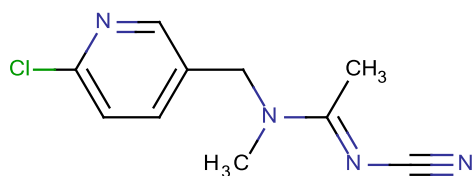
8. Imidaklopriid, $M=255,661$ g/mol



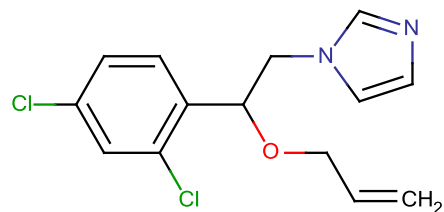
9. Vamidotioon, $M=287,337$ g/mol



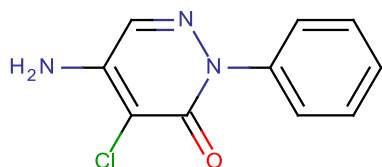
10. Atseetampiirid, M=222,674 g/mol



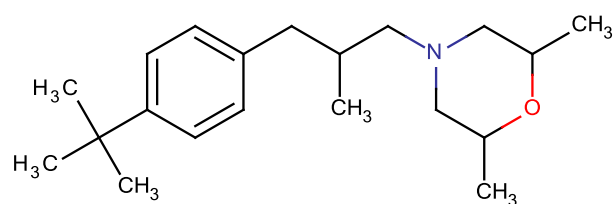
15. Imasaliil, M=297,180 g/mol



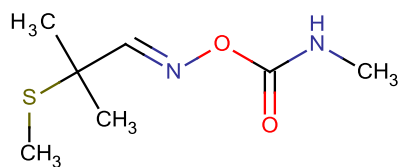
11. Kloridasoon, M=221,643 g/mol



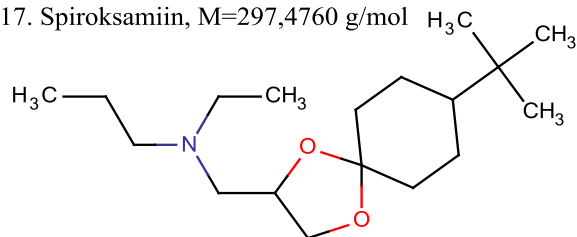
16. Fenpropimorf, M=303,4821 g/mol



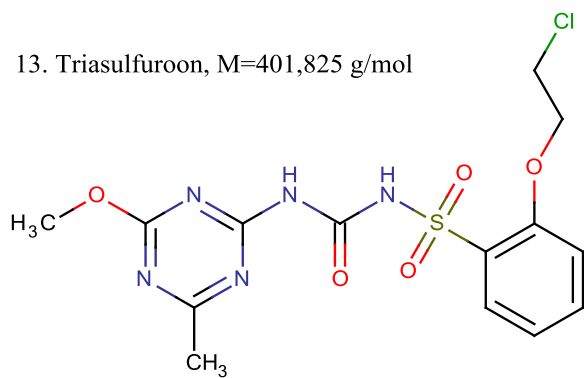
12. Aldikarb, M=190,263 g/mol



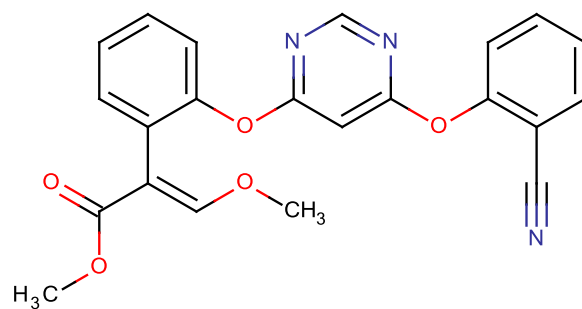
17. Spiroksamiin, M=297,4760 g/mol



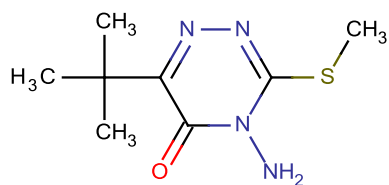
13. Triasulfuroon, M=401,825 g/mol



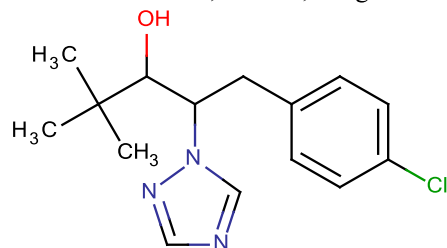
18. Asoksüstrobiin, M=403,3875 g/mol



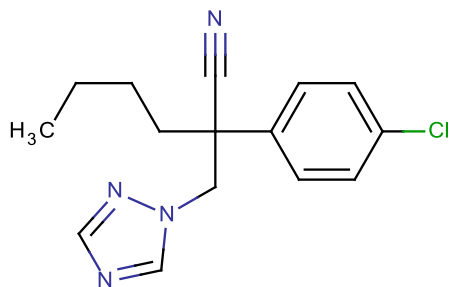
14. Metribusiin, M=214,288 g/mol



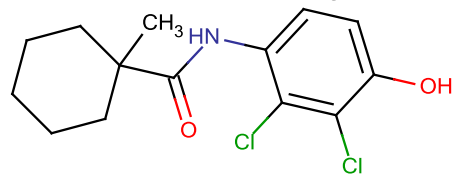
19. Paklobutrasool, M=293,792 g/mol



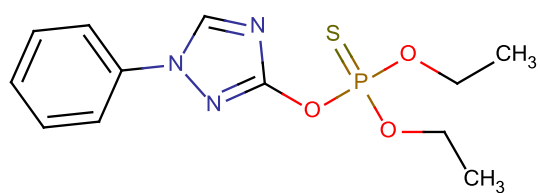
20. Müklobutaniil, M=288,775 g/mol



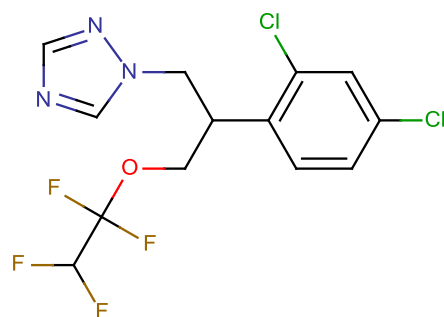
24. Fenheksamiid, M=302,196 g/mol



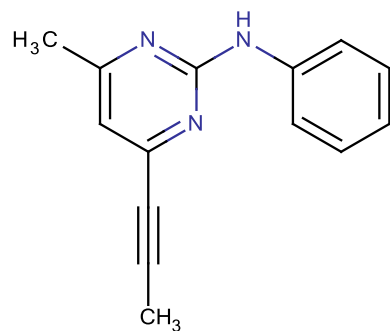
21. Triasofoss, M=313,313 g/mol



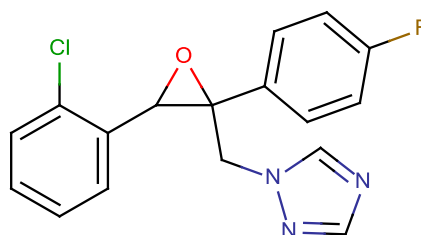
25. Tetrakonasool, M=372,146 g/mol



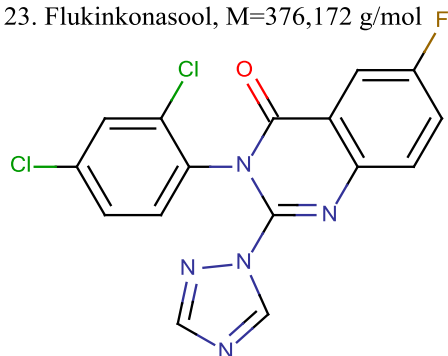
22. Mepanipüriim, M=223,2731 g/mol



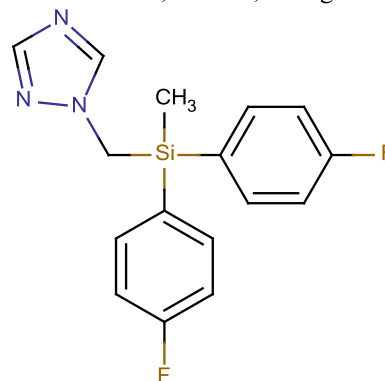
26. Epoksikonasool, M=329,756 g/mol



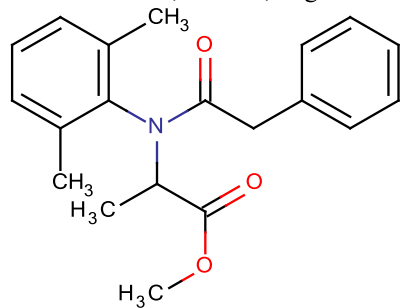
23. Flukinkonasool, M=376,172 g/mol



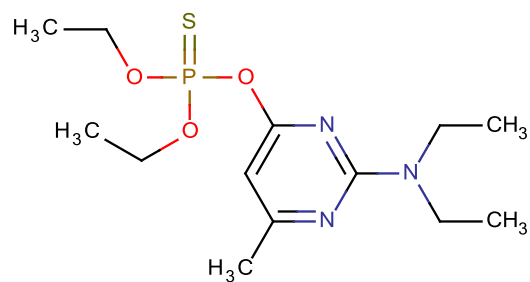
27. Flusilasool, M=315,3927 g/mol



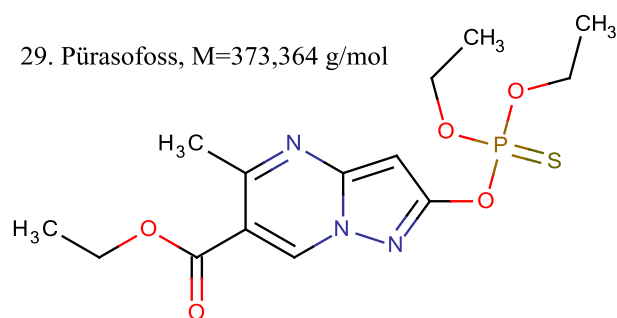
28. Benalaksüül, M=325,40 g/mol



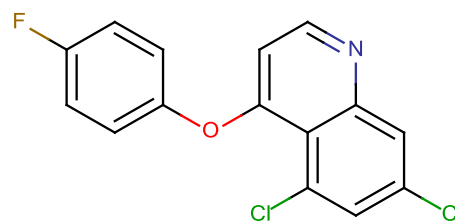
32. Pirimifoss-etiül, M=333,387 g/mol



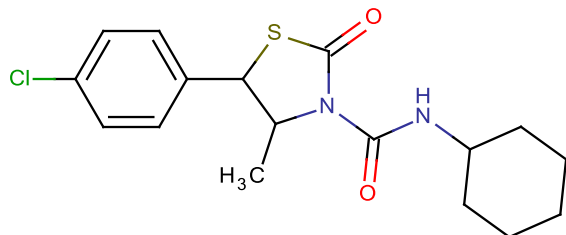
29. Pürasofoss, M=373,364 g/mol



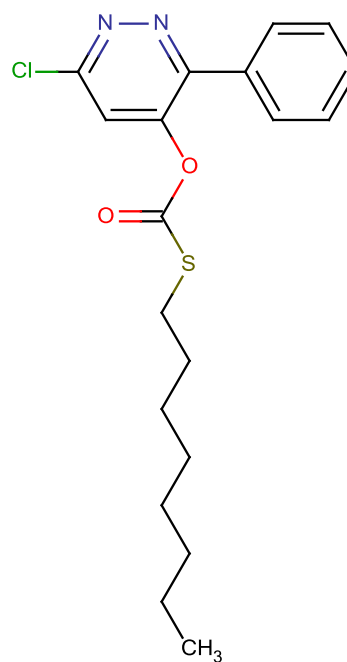
33. Kinoksüfeen, M=308,135 g/mol



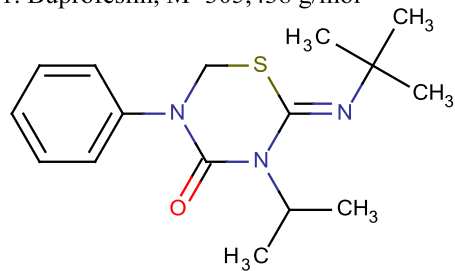
30. Heksütiasoks, M=352,879 g/mol



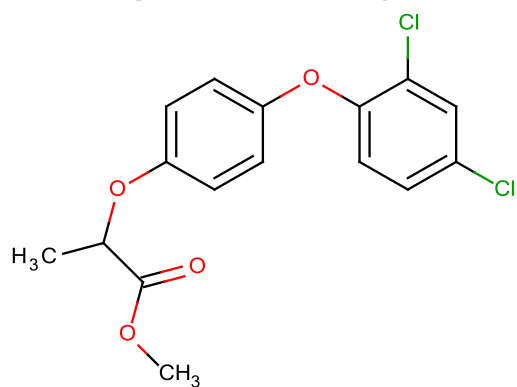
34. Püridaat, M=378,916 g/mol



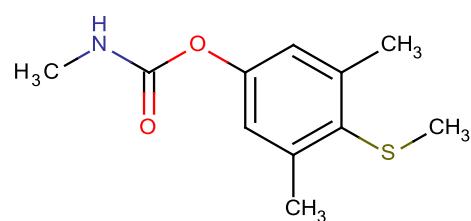
31. Buprofesiin, M=305,438 g/mol



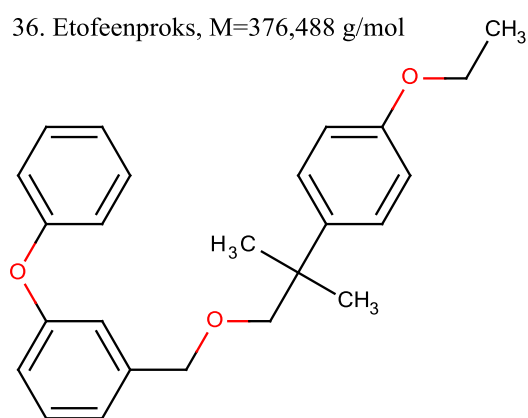
35. Diklofop-metüül, M=341,186 g/mol



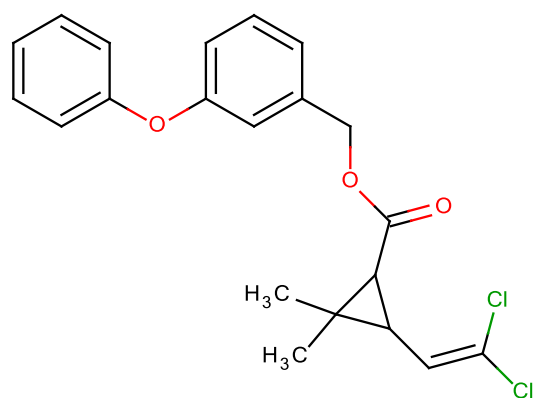
39. Metiokarb, M=225,307 g/mol



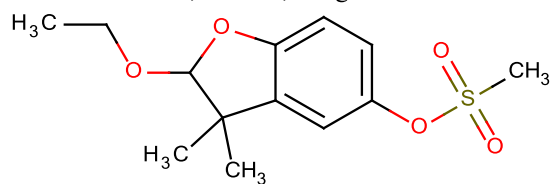
36. Etofeenproks, M=376,488 g/mol



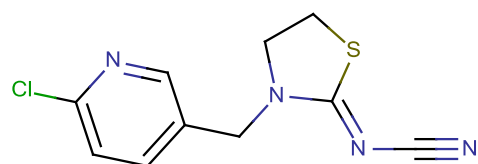
40. Permetriin, M=391,288 g/mol



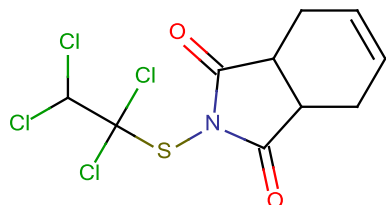
37. Etofumesaat, M=286,344 g/mol



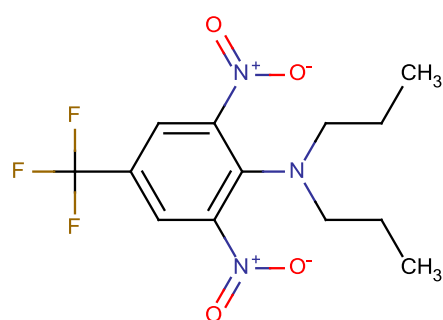
41. Tiaklopriid, M=252,723 g/mol



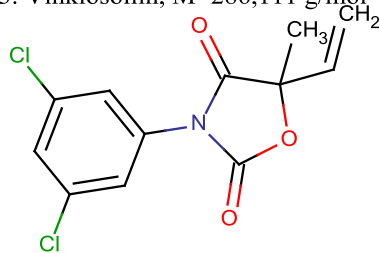
38. Kaptafool, M=349,061 g/mol



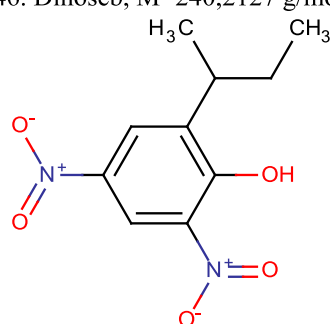
42. Trifluraliin, M=335,279 g/mol



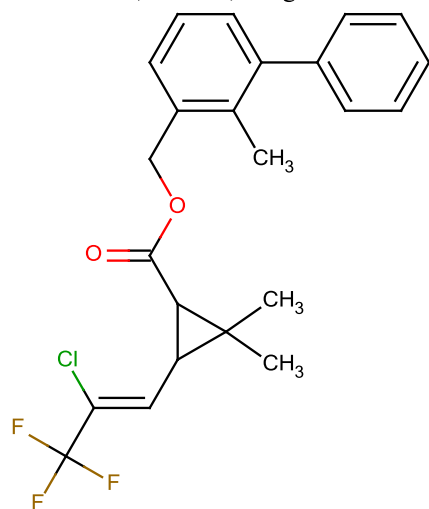
43. Vinklosoliin, M=286,111 g/mol



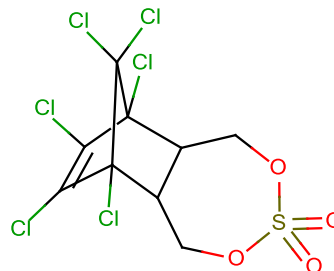
46. Dinoseb, M=240,2127 g/mol



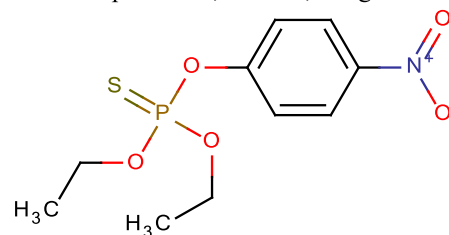
44. Bifentriin, M=422,868 g/mol



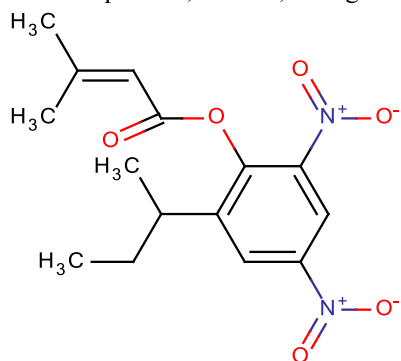
47. Endosulfaan-sulfaat, M=422,925 g/mol



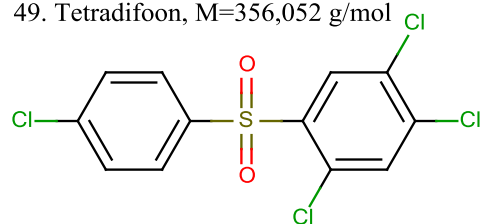
48. Etüül-paratioon, M=291,261 g/mol



45. Binapakrüül, M=322,3132 g/mol



49. Tetradifoon, M=356,052 g/mol

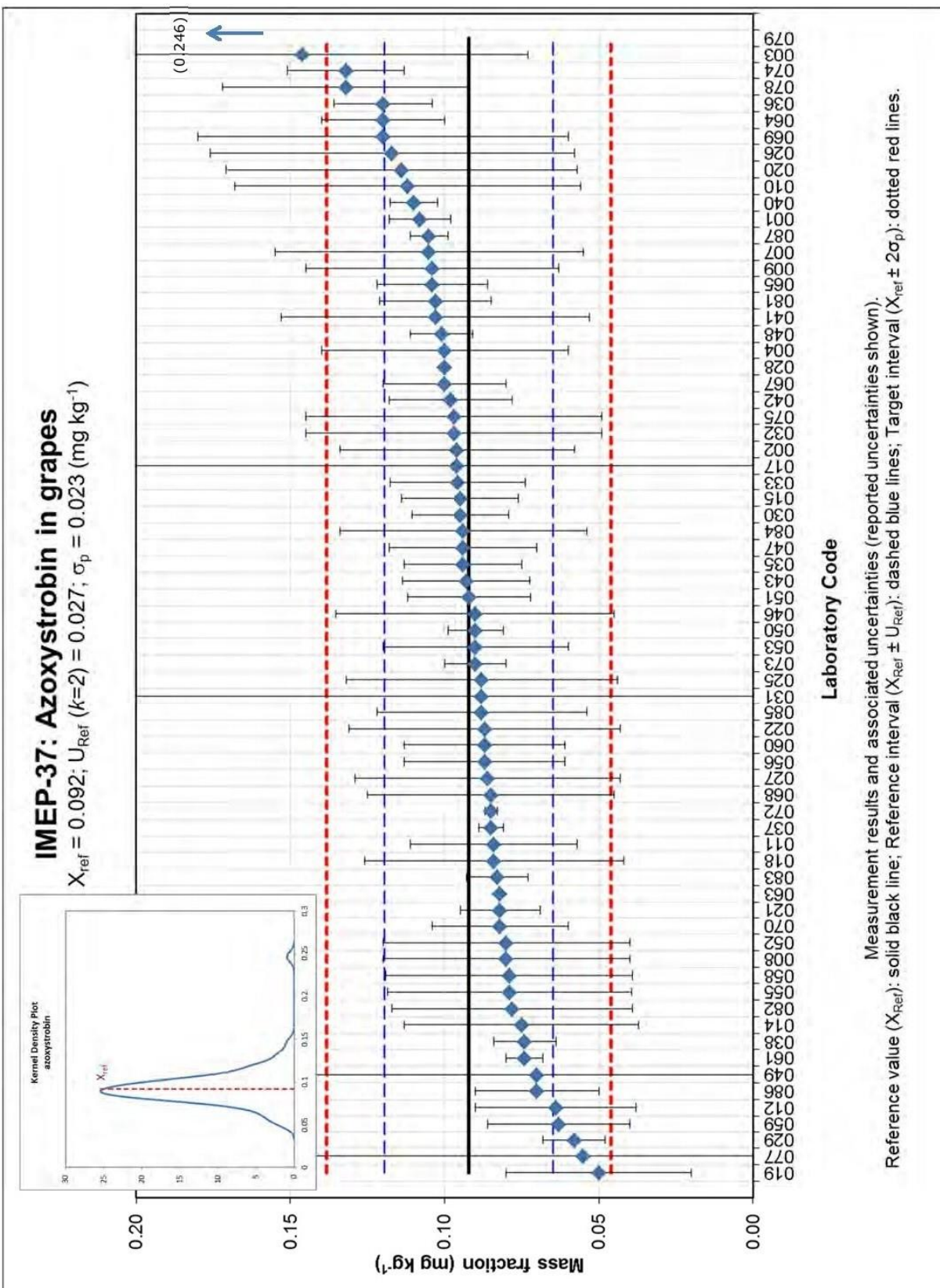


Pädevuskatsete graafikud ja tabelid [21]

Järgnevalt on toodud pädevuskatsete korraldajate poolt väljastatud graafikud ja tabelid uuritud pestitsiidide kohta. Saadud tulemuste labori kood on 018.

Asoksüstrobiini tulemused

Lab Code	X_{lab}	U_{lab}	k	Technique	u_{lab}	z-score	z-score	uncert.
001	0.108	0.010	2	GC-MS (QqQ)	0.005	0.69	1.08	b
002	0.096	0.038	0.022	LC-MS (QqQ)	1.727273	0.16	0.00	c
003	0.146	0.073	83.5	LC-MS (QqQ)	0.000874	2.33	3.91	b
004	0.10	0.040	2	GC-MS (QqQ)	0.02	0.34	0.32	a
007	0.105	0.05	1	LC-MS (QqQ)	0.05	0.56	0.25	c
008	0.08	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.53	-0.50	a
009	0.104	0.041	2	LC-MS (QqQ)	0.0205	0.51	0.48	a
010	0.112	0.056	2	LC-MS (QqQ)	0.028	0.86	0.64	c
011	0.084	0.027	98	LC-MS (QqQ)	0.000276	-0.36	-0.60	b
012	0.064	0.026	2	LC-MS (QqQ)	0.013	-1.22	-1.49	b
014	0.075	0.038	2	LC-MS (QqQ)	0.019	-0.75	-0.73	a
015	0.095	0.019	2	GC-MS (Q)	0.0095	0.12	0.17	b
017	0.0960	30	2.0	GC-MS (Q)	15	0.16	0.00	c
018	0.084	0.042	2	LC-MS (IT)	0.021	-0.36	-0.33	a
019	0.05	0.03	2	LC-MS (QqQ)	0.015	-1.83	-2.08	a
020	0.114	0.057	2	LC-MS (QqQ)	0.0285	0.95	0.69	c
021	0.082	0.013	2	LC-MS (QqQ)	0.0065	-0.44	-0.67	b
022	0.087	0.044	2	LC-MS (QqQ)	0.022	-0.23	-0.20	a
025	0.088	0.044	2	LC-MS (QqQ)	0.022	-0.18	-0.16	a
026	0.117	0.059	2	GC-MS (IT)	0.0295	1.08	0.76	c
027	0.086	0.043	2	LC-MS (QqQ)	0.0215	-0.27	-0.24	a
028	0.10	0	0	LC-MS (QqQ)	0	0.34	0.57	b
029	0.058	0.01	2	LC-MS (QqQ)	0.005	-1.48	-2.35	b
030	0.0949	0.0157	2	LC-MS (QqQ)	0.00785	0.12	0.17	b
031	0.088	25	2	GC-MS (QqQ)	12.5	-0.18	0.00	c
032	0.097	0.048	2	LC-MS (QqQ)	0.024	0.21	0.17	c
033	0.0958	0.022	1	GC-MS (QqQ)	0.022	0.16	0.14	a
035	0.094	0.019	2	LC-MS (QqQ)	0.0095	0.08	0.11	b
036	0.120	0.016	2	LC-MS (QqQ)	0.008	1.21	1.75	b
037	0.085	0.004	2	GC/ECD	0.002	-0.31	-0.52	b
038	0.074	0.010	2	LC-MS (QqQ)	0.005	-0.79	-1.25	b
040	0.110	0.0078	2	GC-MS (Q)	0.0039	0.77	1.25	b
041	0.103	0.05	2	LC-MS (QqQ)	0.025	0.47	0.38	c
042	0.098	0.020	2	LC-MS (QqQ)	0.01	0.25	0.34	b
043	0.093	0.02062	2	LC-MS (QqQ)	0.01031	0.03	0.05	b
046	0.0901	0.0451	2	LC-MS (QqQ)	0.02255	-0.09	-0.08	a
047	0.094	0.024	0.99	GC-MS (Q)	0.024242	0.08	0.06	c
048	0.101	0.010	97	LC-MS (QqQ)	0.000103	0.38	0.64	b
049	0.07	20	1.10	GC-MS (Q)	18.18182	-0.96	0.00	c
050	0.090	0.009	2	GC-MS (Q)	0.0045	-0.10	-0.15	b
051	0.092	0.020	2.3	LC-MS (QqQ)	0.008696	-0.01	-0.01	b
052	0.08	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.53	-0.50	a
053	0.09	0.03	2	GC-MS (TOF)	0.015	-0.10	-0.11	a
055	0.079	0.0395	2	LC-MS (QqQ)	0.01975	-0.57	-0.55	a
056	0.087	0.026	2	LC-MS (QqQ)	0.013	-0.23	-0.28	b
058	0.079	0.040	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.57	-0.54	a
059	0.063	0.023	2	GC-ECD/NPD	0.0115	-1.27	-1.63	b
060	0.087	0.026	2	LC-MS (QqQ)	0.013	-0.23	-0.28	b
061	0.074	0.00598	2	LC-MS (QqQ)	0.00299	-0.79	-1.30	b
063	0.082	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.44	-0.75	b
064	0.12	0.02	2	GC-MS (IT)	0.01	1.21	1.64	b
065	0.104	0.018	2	GC-MS (Q)	0.009	0.51	0.72	b
067	0.100	0.02	2	LC-MS (QqQ)	0.01	0.34	0.46	b
068	0.085	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.31	-0.30	a
069	0.12	0.06	2	GC-MS (Q)	0.03	1.21	0.84	c
070	0.082	0.022	2	LC-MS (QqQ)	0.011	-0.44	-0.58	b
072	0.085	0.002	2	LC-MS (QqQ)	0.001	-0.31	-0.52	b
073	0.09	0.01	2		0.005	-0.10	-0.15	b
074	0.132	0.019	2	UPLC-MS/MS	0.0095	1.73	2.39	b
075	0.097	0.048	2	GC-MS (Q)	0.024	0.21	0.17	c
077	0.055	0.5	2	LC-MS (QqQ)	0.25	-1.61	-0.15	c
078	0.132	0.04	2	GC-MS (Q)	0.02	1.73	1.64	a
079	0.246	0.018	2	GC-MS (Q)	0.009	6.67	9.39	b
081	0.103	0.018	2	GC-MS (Q)	0.009	0.47	0.66	b
082	0.078	0.039	2	LC-MS (QqQ)	0.0195	-0.62	-0.60	a
083	0.083	0.010	2	GC-MS (QqQ)	0.005	-0.40	-0.63	b
084	0.094	0.040	2	GC-ECD	0.02	0.08	0.07	a
085	0.088	0.034	2	GC-MS (QqQ)	0.017	-0.18	-0.19	a
086	0.07	0.02	2	LC-MS (Q)	0.01	-0.96	-1.31	b
087	0.105	0.006	2	LC-MS (Q : QqQ)	0.003	0.56	0.91	b

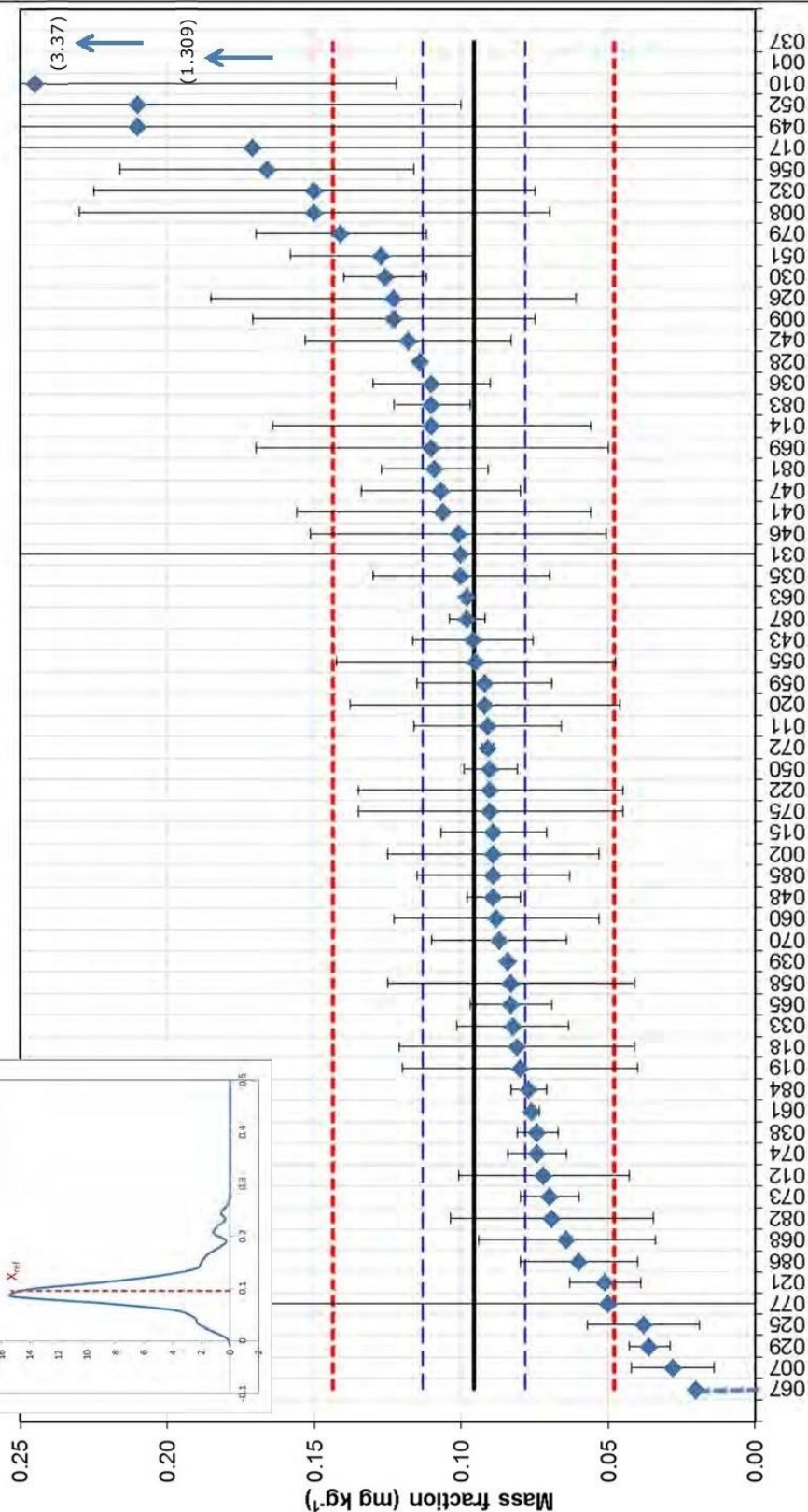
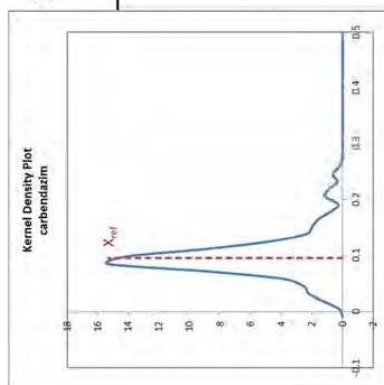


Karbendasiimi tulemused

Lab Code	X _{lab}	U _{lab}	k	Technique	u _{lab}	z-score	z-score	uncert.
001	1.309	0.014	2	LC-MS (QqQ)	0.007	50.70	108.37	b
002	0.089	0.036	0.016	LC-MS (QqQ)	2.25	-0.28	0.00	c
007	0.028	0.014	1	LC-MS (QqQ)	0.014	-2.83	-4.10	a
008	0.15	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	2.27	1.33	c
009	0.123	0.048	2	LC-MS (QqQ)	0.024	1.14	1.07	c
010	0.245	0.123	2	LC-MS (QqQ)	0.0615	6.24	2.40	c
011	0.091	0.025	98	LC-MS (QqQ)	0.000255	-0.20	-0.54	b
012	0.072	0.029	2	LC-MS (QqQ)	0.0145	-0.99	-1.40	a
014	0.11	0.054	2	LC-MS (QqQ)	0.027	0.60	0.50	c
015	0.089	0.018	2	LC-FLD	0.009	-0.28	-0.54	a
017	0.171	30	2	LC-MS (Q)	15	3.15	0.01	c
018	0.081	0.04	2	LC-MS (IT)	0.02	-0.62	-0.67	a
019	0.08	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.66	-0.72	a
020	0.092	0.046	2	LC-MS (QqQ)	0.023	-0.16	-0.15	a
021	0.051	0.012	2	LC-MS (QqQ)	0.006	-1.87	-4.22	b
022	0.09	0.045	2	LC-MS (QqQ)	0.0225	-0.24	-0.24	a
025	0.038	0.019	2	LC-MS (QqQ)	0.0095	-2.41	-4.17	a
026	0.123	0.062	2	LC-MS (QqQ)	0.031	1.14	0.85	c
028	0.114	0	0	LC-MS (QqQ)	0	0.76	2.09	b
029	0.036	0.007	2	LC-MS (QqQ)	0.0035	-2.50	-6.14	b
030	0.1259	0.0142	2	LC-MS (QqQ)	0.0071	1.26	2.68	b
031	0.1	25	2	LC-MS (QqQ)	12.5	0.18	0.00	c
032	0.15	0.075	2	LC-MS (QqQ)	0.0375	2.27	1.41	c
033	0.0824	0.019	1	LC-MS (QqQ)	0.019	-0.56	-0.64	a
035	0.1	0.03	2	LC-MS (QqQ)	0.015	0.18	0.25	a
036	0.11	0.02	2	LC-MS (QqQ)	0.01	0.60	1.08	a
037	3.37	0.325	2	HPLC/UV	0.1625	136.83	20.12	c
038	0.074	0.007	2	LC-MS (QqQ)	0.0035	-0.91	-2.31	b
039	0.084	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.49	-1.34	b
041	0.106	0.05	2	LC-MS (QqQ)	0.025	0.43	0.39	c
042	0.118	0.035	2	LC-MS (QqQ)	0.0175	0.93	1.14	a
043	0.096	0.02033	2	LC-MS (QqQ)	0.010165	0.01	0.02	a
046	0.101	0.0505	2	LC-MS (QqQ)	0.02525	0.22	0.20	c
047	0.107	0.027	1.33	LC-MS (QqQ)	0.020301	0.47	0.51	a
048	0.089	0.009	91	LC-MS (QqQ)	9.89E-05	-0.28	-0.77	b
049	0.21	14	1.23	LC-MS (QqQ)	11.38211	4.78	0.01	c
050	0.09	0.009	2	LC-MS (QqQ)	0.0045	-0.24	-0.58	b
051	0.127	0.031	2.3	LC-MS (QqQ)	0.013478	1.31	1.95	a
052	0.21	0.11	2	LC-MS (QqQ)	0.055	4.78	2.05	c
055	0.095	0.0475	2	LC-MS (QqQ)	0.02375	-0.03	-0.03	a
056	0.166	0.05	2	LC-MS (QqQ)	0.025	2.94	2.65	c
058	0.083	0.042	2	LC-MS (QqQ)	0.021	-0.53	-0.56	a
059	0.092	0.023	2	UPLC/DAD	0.0115	-0.16	-0.26	a
060	0.088	0.035	2	LC-MS (QqQ)	0.0175	-0.32	-0.39	a
061	0.076	0.00256	2	LC-MS (QqQ)	0.00128	-0.82	-2.23	b
063	0.098	0	0	LC-MS (QqQ)	0	0.10	0.26	b
065	0.083	0.014	2	HPLC-UV	0.007	-0.53	-1.14	b
067	< 0.02			GC-MS (QqQ)				
068	0.064	0.03	2	LC-MS (QqQ)	0.015	-1.33	-1.83	a
069	0.11	0.06	2	LC-MS (QqQ)	0.03	0.60	0.46	c
070	0.087	0.023	2	LC-MS (QqQ)	0.0115	-0.36	-0.60	a
072	0.091	0.002	2	LC-MS (QqQ)	0.001	-0.20	-0.54	b
073	0.07	0.01	2		0.005	-1.07	-2.55	b
074	0.074	0.01	2	UPLC-MS/MS	0.005	-0.91	-2.16	b
075	0.09	0.045	2	LC-MS (QqQ)	0.0225	-0.24	-0.24	a
077	0.05	0.5	2	LC-MS (QqQ)	0.25	-1.91	-0.18	c
079	0.141	0.029	2	LC-MS (QqQ)	0.0145	1.89	2.67	a
081	0.109	0.018	2	LC-MS (QqQ)	0.009	0.55	1.06	a
082	0.069	0.0345	2	LC-MS (QqQ)	0.01725	-1.12	-1.38	a
083	0.11	0.013	2	LC-MS (QqQ)	0.0065	0.60	1.31	b
084	0.077	0.006	2	HPLC-UV vis	0.003	-0.78	-2.03	b
085	0.089	0.026	2	LC-MS (QqQ)	0.013	-0.28	-0.43	a
086	0.06	0.02	2	LC-MS (Q)	0.01	-1.49	-2.69	a
087	0.098	0.006	2	LC-MS (Q : QqQ)	0.003	0.10	0.25	b

IMEP-37: Carbendazim in grapes

$X_{\text{ref}} = 0.096$; $U_{\text{ref}} (k=2) = 0.017$; $\sigma_p = 0.024$ (mg kg^{-1})



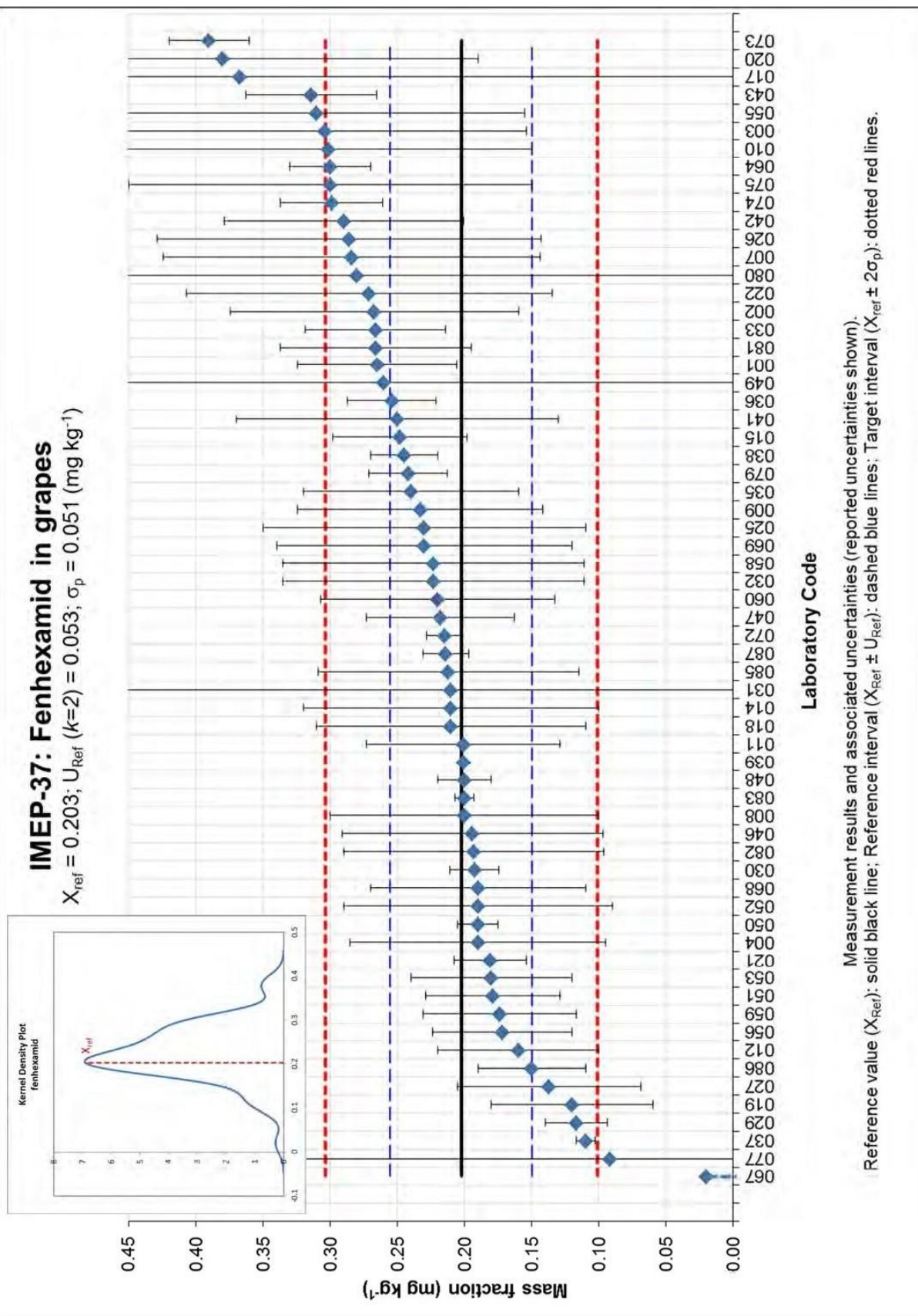
Laboratory Code

Measurement results and associated uncertainties (reported uncertainties shown).

Reference value (X_{ref}): solid black line; Reference interval ($X_{\text{ref}} \pm U_{\text{ref}}$): dashed blue lines; Target interval ($X_{\text{ref}} \pm 2\sigma_p$): dotted red lines.

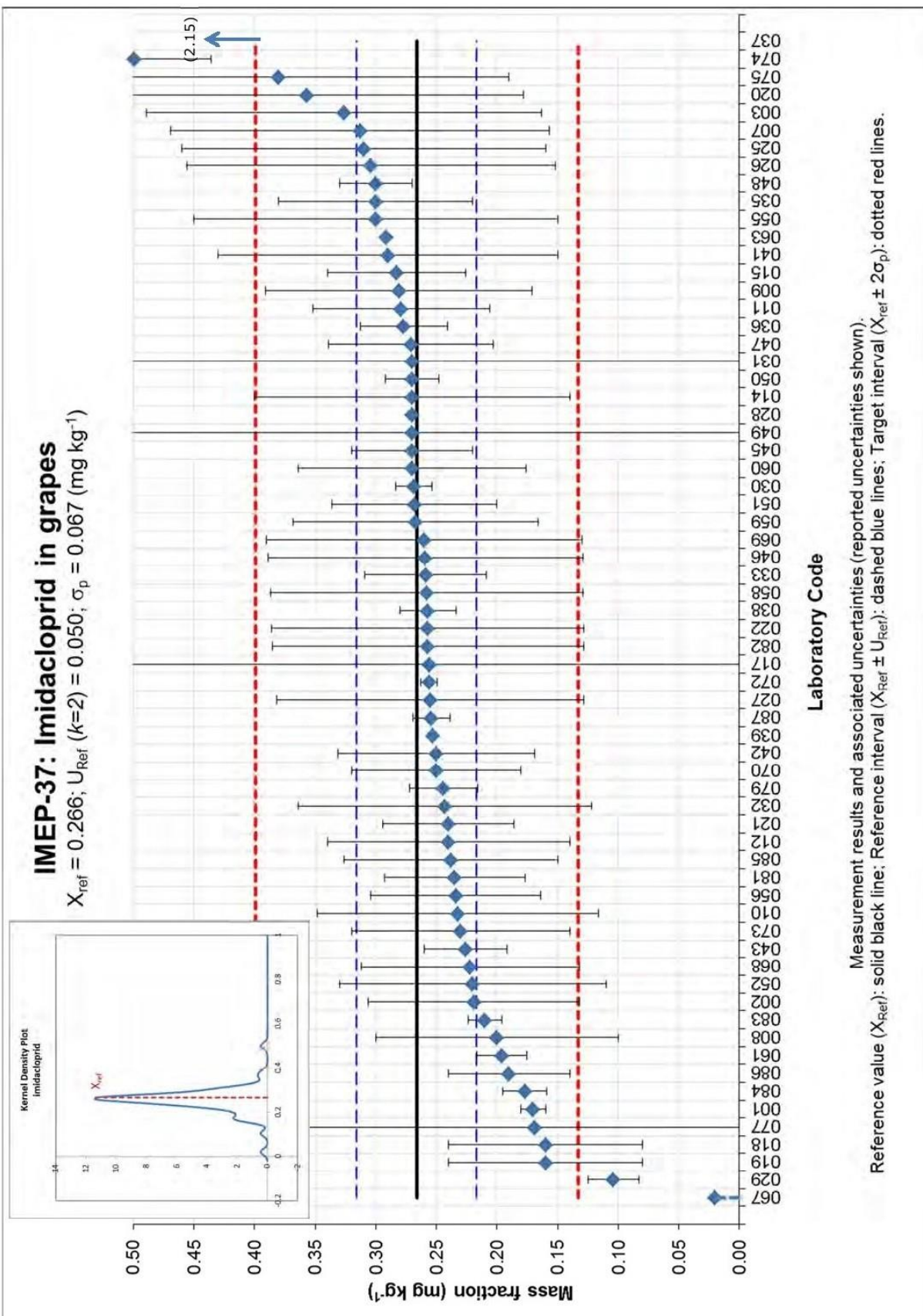
Fenheksamiidi tulemused

Lab Code	X_{lab}	U_{lab}	k	Technique	u_{lab}	z-score	z-score	uncert.
001	0.265	0.059	2	GC-MS (QqQ)	0.0295	1.23	1.58	a
002	0.267	0.107	0.008	LC-MS (QqQ)	13.375	1.27	0.00	c
003	0.304	0.1502	78.5	LC-MS (QqQ)	0.001913	2.00	3.82	b
004	0.19	0.095	2	GC-MS (QqQ)	0.0475	-0.24691	-0.2298	a
007	0.284	0.14	1	LC-MS (QqQ)	0.14	1.61	0.57	c
008	0.2	0.1	2	LC-MS (QqQ)	0.05	-0.05	-0.04	a
009	0.233	0.091	2	LC-MS (QqQ)	0.0455	0.60	0.58	a
010	0.301	0.151	2	LC-MS (QqQ)	0.0755	1.95	1.23	c
011	0.201	0.072	101	LC-MS (QqQ)	0.000713	-0.03	-0.06	b
012	0.16	0.06	2	LC-MS (QqQ)	0.03	-0.84	-1.06	a
014	0.21	0.11	2	LC-MS (QqQ)	0.055	0.15	0.12	c
015	0.248	0.05	2	GC-MS (Q)	0.025	0.90	1.25	b
017	0.367	30	2	GC-MS (Q)	15	1.25	0.01	c
018	0.21	0.1	2	LC-MS (IT)	0.05	0.15	0.13	a
019	0.12	0.06	2	LC-MS (QqQ)	0.03	-1.63	-2.06	a
020	0.38	0.19	2	LC-MS (QqQ)	0.095	1.51	1.80	c
021	0.181	0.027	2	LC-MS (QqQ)	0.0135	-0.42	-0.72	b
022	0.271	0.136	2	LC-MS (QqQ)	0.068	1.35	0.94	c
025	0.23	0.12	2	LC-MS (QqQ)	0.06	0.54	0.42	c
026	0.286	0.143	2	GC-MS (IT)	0.0715	1.65	1.10	c
027	0.137	0.068	2	LC-MS (QqQ)	0.034	-1.29	-1.52	a
029	0.117	0.023	2	LC-MS (QqQ)	0.0115	-1.69	-2.96	b
030	0.1926	0.0183	2	LC-MS (QqQ)	0.00915	-0.20	-0.35	b
031	0.21	25	2	LC-MS (QqQ)	12.5	0.15	0.00	c
032	0.223	0.112	2	LC-MS (QqQ)	0.056	0.40	0.33	c
033	0.2663	0.052	1	LC-MS (QqQ)	0.052	1.26	1.09	c
035	0.24	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	0.74	0.78	a
036	0.254	0.033	2	LC-MS (QqQ)	0.0165	1.02	1.65	b
037	0.11	0.007	2	GC-MS (Q)	0.0035	-1.83	3.46	b
038	0.245	0.025	2	LC-MS (QqQ)	0.0125	0.84	1.45	b
039	0.201	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.03	-0.06	b
041	0.25	0.12	2	LC-MS (QqQ)	0.06	0.94	0.72	c
042	0.29	0.089	2	GC-MS (QqQ)	0.0445	1.73	1.69	a
043	0.314	0.04853	2	GC-MS (TOF)	0.024265	2.20	3.10	b
046	0.194	0.097	2	LC-MS (QqQ)	0.0485	-0.17	-0.15	a
047	0.218	0.055	1.02	GC-MS (Q)	0.053922	0.31	0.26	c
048	0.2	0.02	98	LC-MS (QqQ)	0.000204	-0.05	-0.09	b
049	0.26	14	0.84	LC-MS (QqQ)	16.66667	1.14	0.00	c
050	0.19	0.015	2	GC-MS (Q)	0.0075	-0.24691	-0.4538	b
051	0.179	0.05	2.4	LC-MS (QqQ)	0.020833	-0.46	-0.70	b
052	0.19	0.1	2	LC-MS (QqQ)	0.05	-0.25	-0.22	a
053	0.18	0.06	2	GC-MS (TOF)	0.03	-0.44	-0.56	a
055	0.31	0.155	2	LC-MS (QqQ)	0.0775	2.12	1.31	c
056	0.172	0.052	2	LC-MS (QqQ)	0.026	-0.60	-0.82	b
058	0.223	0.112	2	LC-MS (QqQ)	0.056	0.40	0.33	c
059	0.174	0.057	2	GC-ECD/NPD	0.0285	-0.56	-0.73	a
060	0.22	0.087	2	LC-MS (QqQ)	0.0435	0.35	0.34	a
064	0.3	0.03	2	GC-MS (IT)	0.015	1.93	3.20	b
067	< 0.02			GC-MS (QqQ)				
068	0.19	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	-0.25	-0.26	a
069	0.23	0.11	2	LC-MS (QqQ)	0.055	0.54	0.45	c
072	0.215	0.013	2	LC-MS (QqQ)	0.0065	0.25	0.46	b
073	0.39	0.03	2		0.015	3.70	6.16	b
074	0.299	0.038	2	UPLC-MS/MS	0.019	1.91	2.96	b
075	0.3	0.15	2	LC-MS (QqQ)	0.075	1.93	1.23	c
077	0.092	0.5	2	LC-MS (QqQ)	0.25	-2.18	-0.44	c
079	0.242	0.029	2	GC-MS (Q)	0.0145	0.78	1.31	b
080	0.28	0.405	2	GC-MS	0.2025	1.53	0.38	c
081	0.266	0.071	2	GC-MS (Q)	0.0355	1.25	1.43	a
082	0.193	0.0965	2	LC-MS (QqQ)	0.04825	-0.19	-0.17	a
083	0.2	0.007	2	LC-MS (QqQ)	0.0035	-0.05	-0.09	b
085	0.212	0.097	2	LC-MS (QqQ)	0.0485	0.19	0.17	a
086	0.15	0.04	2	LC-MS (Q)	0.02	-1.04	-1.58	b
087	0.214	0.017	2	LC-MS (Q : QqQ)	0.0085	0.23	0.41	b



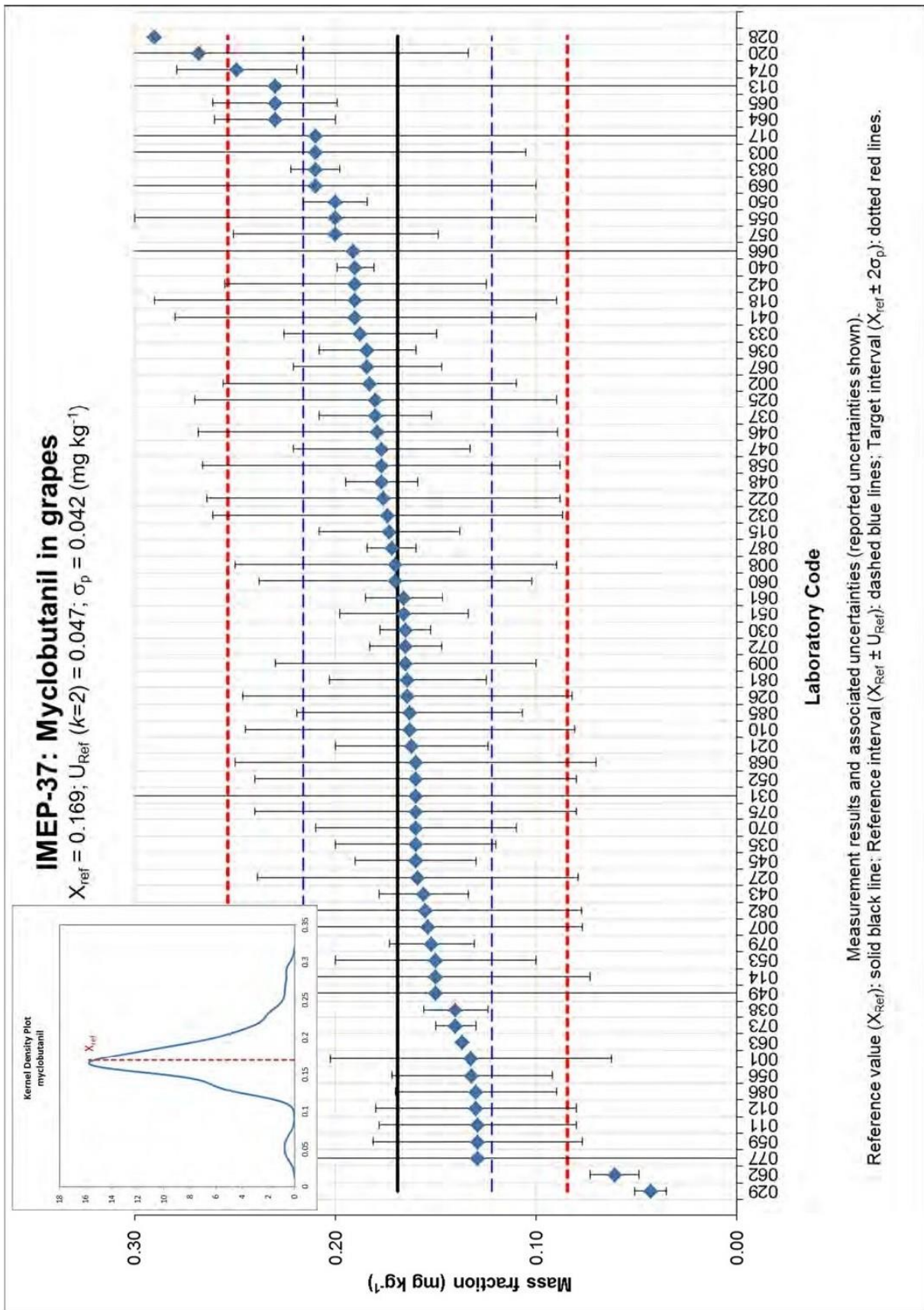
Imidaklopriidi tulemused

Lab Code	X _{lab}	U _{lab}	k	Technique	u _{lab}	z-score	ζ-score	uncert.
001	0.17	0.01	2	LC-MS (QqQ)	0.005	-1.44	-1.81	b
002	0.219	0.087	0.01	LC-MS (QqQ)	8.7	-0.71	-0.01	c
003	0.326	0.163	77.5	LC-MS (QqQ)	0.002103	0.90	2.41	b
007	0.313	0.156	1	LC-MS (QqQ)	0.156	0.70	0.30	c
008	0.2	0.1	2	LC-MS (QqQ)	0.05	-0.99	-1.18	a
009	0.281	0.11	2	LC-MS (QqQ)	0.055	0.22	0.25	a
010	0.232	0.116	2	LC-MS (QqQ)	0.058	-0.51	-0.54	a
011	0.279	0.073	103	LC-MS (QqQ)	0.000709	0.19	0.52	b
012	0.24	0.1	2	LC-MS (QqQ)	0.05	-0.39	-0.47	a
014	0.27	0.13	2	LC-MS (QqQ)	0.065	0.06	0.06	a
015	0.283	0.057	2	LC-MS (IT)	0.0285	0.25	0.45	a
017	0.256	30	2	LC-MS (Q)	15	-0.15	0.00	c
018	0.16	0.08	2	LC-MS (IT)	0.04	-1.59	-2.26	a
019	0.16	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	-1.59489	-2.25562	a
020	0.357	0.179	2	LC-MS (QqQ)	0.0895	1.37	0.98	c
021	0.24	0.054	2	LC-MS (QqQ)	0.027	-0.39	-0.71	a
022	0.257	0.129	2	LC-MS (QqQ)	0.0645	-0.14	-0.13	a
025	0.31	0.15	2	LC-MS (QqQ)	0.075	0.66	0.56	c
026	0.304	0.152	2	LC-MS (QqQ)	0.076	0.57	0.47	c
027	0.255	0.127	2	LC-MS (QqQ)	0.0635	-0.17	-0.16	a
028	0.27	0	0	LC-MS (QqQ)	0	0.06	0.16	b
029	0.104	0.021	2	LC-MS (QqQ)	0.0105	-2.44	-4.03	b
030	0.2685	0.0151	2	LC-MS (QqQ)	0.00755	0.04	0.09	b
031	0.27	25	2	LC-MS (QqQ)	12.5	0.06	0.00	c
032	0.243	0.121	2	LC-MS (QqQ)	0.0605	-0.35	-0.35	a
033	0.2588	0.05	1	LC-MS (QqQ)	0.05	-0.11	-0.13	a
035	0.3	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	0.51	0.72	a
036	0.277	0.036	2	LC-MS (QqQ)	0.018	0.16	0.36	b
037	2.15	0.198	2	HPLC/UV	0.099	28.32	18.46	c
038	0.257	0.023	2	LC-MS (QqQ)	0.0115	-0.14	-0.33	b
039	0.253	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.20	-0.53	b
041	0.29	0.14	2	LC-MS (QqQ)	0.07	0.36	0.32	c
042	0.25	0.081	2	LC-MS (QqQ)	0.0405	-0.24	-0.34	a
043	0.226	0.03418	2	LC-MS (QqQ)	0.01709	-0.60	-1.33	b
045	0.27	0.05	2	LC-MS (ESI Quadrupole)	0.025	0.06	0.11	a
046	0.259	0.13	2	LC-MS (QqQ)	0.065	-0.11	-0.10	a
047	0.271	0.068	1	GC-MS (QqQ)	0.068	0.07	0.07	c
048	0.3	0.03	99	LC-MS (QqQ)	0.000303	0.51	1.37	b
049	0.27	8	0.74	LC-MS (QqQ)	10.81081	0.058625	0.000361	c
050	0.27	0.022	2	LC-MS (QqQ)	0.011	0.06	0.14	b
051	0.268	0.068	2.2	LC-MS (QqQ)	0.030909	0.03	0.05	a
052	0.22	0.11	2	LC-MS (QqQ)	0.055	-0.69	-0.76	a
055	0.3	0.15	2	LC-MS (QqQ)	0.075	0.51	0.43	c
056	0.234	0.07	2	LC-MS (QqQ)	0.035	-0.48	-0.75	a
058	0.258	0.129	2	LC-MS (QqQ)	0.0645	-0.12	-0.12	a
059	0.267	0.101	2	UPLC/DAD	0.0505	0.01	0.02	a
060	0.27	0.094	2	LC-MS (QqQ)	0.047	0.06	0.07	a
061	0.196	0.02036	2	LC-MS (QqQ)	0.01018	-1.05	-2.62	b
063	0.291	0	0	LC-MS (QqQ)	0	0.37	1.01	b
067	< 0.02			GC-MS (QqQ)				
068	0.222	0.09	2	LC-MS (QqQ)	0.045	-0.66	-0.86	a
069	0.26	0.13	2	LC-MS (QqQ)	0.065	-0.09	-0.09	a
070	0.25	0.07	2	LC-MS (QqQ)	0.035	-0.24	-0.38	a
072	0.256	0.007	2	LC-MS (QqQ)	0.0035	-0.15	-0.40	b
073	0.23	0.09	2		0.045	-0.54	-0.70	a
074	0.499	0.063	2	UPLC-MS/MS	0.0315	1.50	5.81	a
075	0.38	0.19	2	LC-MS (QqQ)	0.095	1.71	1.16	c
077	0.169	0.5	2	LC-MS (QqQ)	0.25	-1.46	-0.39	c
079	0.244	0.028	2	LC-MS (QqQ)	0.014	-0.33	-0.78	b
081	0.235	0.058	2	LC-MS (QqQ)	0.029	-0.47	-0.82	a
082	0.257	0.1285	2	LC-MS (QqQ)	0.06425	-0.14	-0.13	a
083	0.21	0.014	2	LC-MS (QqQ)	0.007	-0.84	-2.18	b
084	0.177	0.018	2	HPLC-UV vis	0.009	-1.34	-3.38	b
085	0.238	0.088	2	LC-MS (QqQ)	0.044	-0.42	-0.56	a
086	0.19	0.05	2	LC-MS (Q)	0.025	-1.14	-2.16	a
087	0.254	0.015	2	LC-MS(Q : QqQ)	0.0075	-0.18	-0.47	b



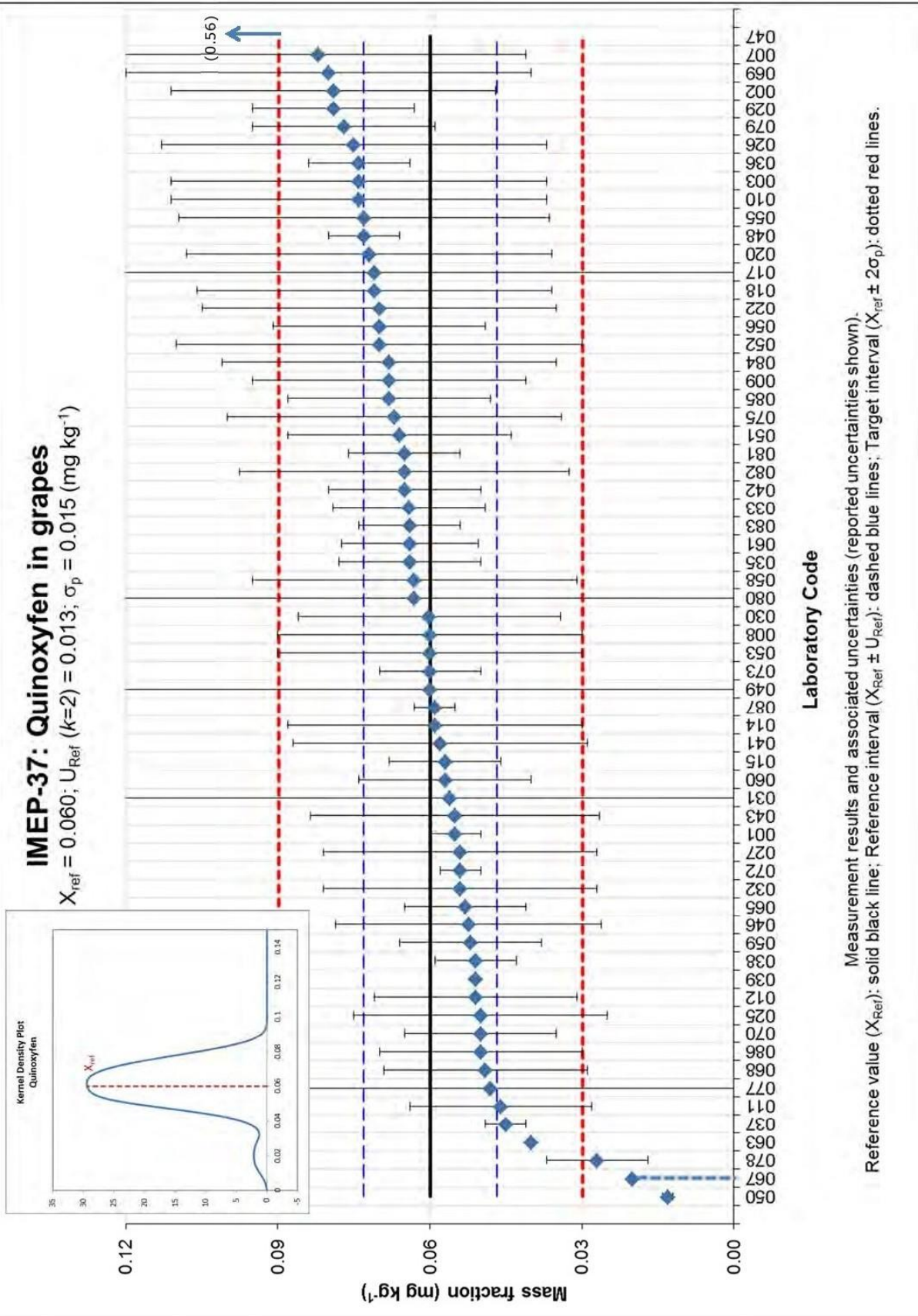
Müklobutaniili tulemused

Lab Code	X _{lab}	U _{lab}	k	Technique	u _{lab}	z-score	z-score	uncert.
001	0.1326	0.07	2	GC-MS (QqQ)	0.035	-0.86	-0.86	a
002	0.183	0.073	0.015	GC-MS (QqQ)	4.866667	0.329824	0.002864	c
003	0.21	0.105	77.5	LC-MS (QqQ)	0.001355	0.97	1.73	b
007	0.154	0.077	1	GC-MS (QqQ)	0.077	-0.36	-0.19	c
008	0.17	0.08	2	GC-MS (QqQ)	0.04	0.02	0.02	a
009	0.165	0.065	2	GC-MS (Q)	0.0325	-0.10	-0.10	a
010	0.163	0.082	2	GC-MS (QqQ)	0.041	-0.14	-0.13	a
011	0.129	0.049	74	GC-MS (QqQ)	0.000662	-0.95	-1.70	b
012	0.13	0.05	2	GC-MS (QqQ)	0.025	-0.92	-1.14	a
013	0.23	20	2	GC-MS (Q)	10	1.44	0.01	c
014	0.15	0.077	2	LC-MS (QqQ)	0.0385	-0.45	-0.42	a
015	0.173	0.035	2	GC-MS (Q)	0.0175	0.09	0.13	b
017	0.21	30	2	GC-MS (Q)	15	0.97	0.00	c
018	0.19	0.1	2	LC-MS (IT)	0.05	0.50	0.38	c
020	0.268	0.134	2	LC-MS (QqQ)	0.067	2.34	1.39	c
021	0.162	0.038	2	LC-MS (QqQ)	0.019	-0.17	-0.23	b
022	0.176	0.088	2	LC-MS (QqQ)	0.044	0.16	0.14	c
025	0.18	0.09	2	LC-MS (QqQ)	0.045	0.26	0.22	c
026	0.164	0.082	2	GC-MS (IT)	0.041	-0.12	-0.11	a
027	0.159	0.08	2	LC-MS (QqQ)	0.04	-0.24	-0.22	a
028	0.29	0	0	LC-MS (QqQ)	0	2.86	5.13	b
029	0.043	0.008	2	LC-MS (QqQ)	0.004	-2.98	-5.27	b
030	0.1651	0.0125	2	LC-MS (QqQ)	0.00625	-0.09	-0.16	b
031	0.16	25	2	GC-MS (QqQ)	12.5	-0.21	0.00	c
032	0.174	0.087	2	LC-MS (QqQ)	0.0435	0.12	0.10	c
033	0.1876	0.038	1	GC-MS (QqQ)	0.038	0.44	0.41	a
035	0.16	0.04	2	GC-MS (QqQ)	0.02	-0.21	-0.29	b
036	0.184	0.024	2	LC-MS (QqQ)	0.012	0.35	0.56	b
037	0.18	0.028	2	GC-MS (Q)	0.014	0.26	0.40	b
038	0.14	0.016	2	GC-MS (Q)	0.008	-0.69	-1.17	b
040	0.19	0.0093	2	GC-MS (Q)	0.00465	0.50	0.87	b
041	0.19	0.09	2	LC-MS (QqQ)	0.045	0.50	0.41	c
042	0.19	0.065	2	GC-MS (QqQ)	0.0325	0.50	0.52	a
043	0.156	0.02211	2	GC-MS (TOF)	0.011055	-0.31	-0.50	b
045	0.16	0.03	2	GC-MS (EI Quadrupole)	0.015	-0.21	-0.32	b
046	0.179	0.0895	2	GC-MS (Q)	0.04475	0.24	0.20	c
047	0.177	0.044	1.01	GC-MS (Q)	0.043564	0.19	0.16	c
048	0.177	0.018	95	LC-MS (QqQ)	0.000189	0.19	0.34	b
049	0.15	11	1.16	GC-MS (Q)	9.482759	-0.45	0.00	c
050	0.2	0.016	2	GC-MS (Q)	0.008	0.73	1.24	b
051	0.166	0.032	2.3	LC-MS (QqQ)	0.013913	-0.07	-0.11	b
052	0.16	0.08	2	GC-MS (QqQ)	0.04	-0.21	-0.20	a
053	0.15	0.05	2	GC-MS (TOF)	0.025	-0.45	-0.55	a
055	0.2	0.1	2	GC-MS (QqQ)	0.05	0.73	0.56	c
056	0.132	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	-0.88	-1.20	b
057	0.1998	0.051	2	GC-MS	0.0255	0.73	0.89	a
058	0.177	0.089	2	LC-MS (QqQ)	0.0445	0.19	0.16	c
059	0.129	0.052	2	GC-ECD/NPD	0.026	-0.95	-1.14	a
060	0.17	0.068	2	GC-MS (QqQ)	0.034	0.02	0.02	a
061	0.166	0.01921	2	LC-MS (QqQ)	0.009605	-0.07	-0.12	b
062	0.061	0.012	2	GC	0.006	-2.56	-4.44	b
063	0.137	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.76	-1.36	b
064	0.23	0.03	2	GC-MS (IT)	0.015	1.44	2.18	b
065	0.23	0.031	2	GC-MS (Q)	0.0155	1.44	2.16	b
066	0.191	50	2	GC-MS (QqQ)	25	0.52	0.00	c
067	0.184	0.037	2	GC-MS (QqQ)	0.0185	0.35	0.50	b
068	0.16	0.09	2	GC-MS (Q)	0.045	-0.21	-0.18	c
069	0.21	0.11	2	GC-MS (Q)	0.055	0.97	0.68	c
070	0.16	0.05	2	LC-MS (QqQ)	0.025	-0.21	-0.26	a
072	0.165	0.018	2	GC-MS (QqQ)	0.009	-0.10	-0.16	b
073	0.14	0.01	2		0.005	-0.69	-1.21	b
074	0.249	0.03	2	UPLC-MS/MS	0.015	1.89	2.86	b
075	0.16	0.08	2	GC-MS (Q)	0.04	-0.21	-0.20	a
077	0.129	0.5	2	GC-MS (QqQ)	0.25	-0.95	-0.16	c
079	0.152	0.021	2	GC-MS (Q)	0.0105	-0.40	-0.66	b
081	0.164	0.039	2	LC-MS (QqQ)	0.0195	-0.12	-0.17	b
082	0.155	0.0775	2	GC-MS (QqQ)	0.03875	-0.33	-0.31	a
083	0.21	0.012	2	LC-MS (QqQ)	0.006	0.97	1.68	b
085	0.163	0.056	2	GC-MS (QqQ)	0.028	-0.14	-0.17	a
086	0.13	0.04	2	GC-MS (Q)	0.02	-0.92	-1.26	b
087	0.172	0.012	2	LC-MS (Q : QqQ)	0.006	0.07	0.12	b



Kinoksüfeeni tulemused

Lab Code	X_{lab}	U_{lab}	k	Technique	u_{lab}	z-score	z-score	uncert.
001	0.055	0.005	2	GC-MS (QqQ)	0.0025	-0.33	-0.70	b
002	0.079	0.032	0.018	LC-MS (QqQ)	1.777778	1.28	0.01	c
003	0.074	0.037	80.5	LC-MS (QqQ)	0.00046	0.94	2.14	b
007	0.082	0.041	1	LC-MS (QqQ)	0.041	1.48	0.53	c
008	0.06	0.03	2	GC-MS (QqQ)	0.015	0.01	0.01	c
009	0.068	0.027	2	GC-MS (Q)	0.0135	0.54	0.54	a
010	0.074	0.037	2	GC-MS (QqQ)	0.0185	0.94	0.72	c
011	0.046	0.018	72	GC-MS (QqQ)	0.00025	-0.93	-2.11	b
012	0.051	0.02	2	GC-MS (QqQ)	0.01	-0.59432	-0.74391	a
014	0.059	0.029	2	LC-MS (QqQ)	0.0145	-0.06	-0.06	a
015	0.057	0.011	2	GC-MS (Q)	0.0055	-0.19	-0.34	b
017	0.071	30	2	GC-MS (Q)	15	0.74	0.00	c
018	0.071	0.035	2	LC-MS (IT)	0.0175	0.74	0.59	c
020	0.072	0.036	2	LC-MS (QqQ)	0.018	0.81	0.63	c
022	0.07	0.035	2	LC-MS (QqQ)	0.0175	0.67	0.54	c
025	0.05	0.025	2	LC-MS (QqQ)	0.0125	-0.66	-0.70	a
026	0.075	0.038	2	GC-MS (IT)	0.019	1.01	0.75	c
027	0.054	0.027	2	LC-MS (QqQ)	0.0135	-0.39	-0.39	a
029	0.079	0.016	2	LC-MS (QqQ)	0.008	1.28	1.85	a
030	0.0601	0.0259	2	GC-MS (QqQ)	0.01295	0.01	0.01	a
031	0.056	25	2	GC-MS (QqQ)	12.5	-0.26	0.00	c
032	0.054	0.027	2	LC-MS (QqQ)	0.0135	-0.39	-0.39	a
033	0.0641	0.015	1	GC-MS (QqQ)	0.015	0.28	0.26	c
035	0.064	0.014	2	LC-MS (QqQ)	0.007	0.27379	0.427149	a
036	0.074	0.01	2	LC-MS (QqQ)	0.005	0.94	1.71	b
037	0.045	0.004	2	GC/ECD	0.002	-0.99	-2.17	b
038	0.051	0.008	2	GC-MS (Q)	0.004	-0.59	-1.16	b
039	0.051	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-0.59	-1.36	b
041	0.058	0.029	2	GC-MS (QqQ)	0.0145	-0.13	-0.12	a
042	0.065	0.015	2	GC-MS (QqQ)	0.0075	0.34	0.51	a
043	0.055	0.0285	2	GC-MS (TOF)	0.01425	-0.33	-0.31	a
046	0.0524	0.0262	2	GC-MS (Q)	0.0131	-0.50	-0.51	a
047	0.56	0.014	0.87	GC-MS (Q)	0.016092	11.40	28.77	c
048	0.073	0.007	97	LC-MS (QqQ)	7.22E-05	0.87	1.99	b
049	0.06	20	0.97	GC-MS (Q)	20.61856	0.01	0.00	c
050	0.013	0.001	2	GC-MS (Q)	0.0005	-1.13	-2.12	b
051	0.066	0.022	2.3	LC-MS (QqQ)	0.009565	0.41	0.53	a
052	0.07	0.04	2	LC-MS (QqQ)	0.02	0.67	0.48	c
053	0.06	0.03	2	GC-MS (TOF)	0.015	0.01	0.01	c
055	0.073	0.0365	2	GC-MS (QqQ)	0.01825	0.87	0.68	c
056	0.07	0.021	2	LC-MS (QqQ)	0.0105	0.67	0.82	a
058	0.063	0.032	2	LC-MS (QqQ)	0.016	0.21	0.18	c
059	0.052	0.014	2	GC-ECD/NPD	0.007	-0.53	-0.82	a
060	0.057	0.017	2	GC-MS (QqQ)	0.0085	-0.19	-0.27	a
061	0.064	0.0135	2	LC-MS (QqQ)	0.00675	0.27	0.44	a
063	0.04	0	0	LC-MS (QqQ)	0	-1.33	-3.03	b
065	0.053	0.012	2	GC-MS (Q)	0.006	-0.46	-0.78	b
067	< 0.02			GC-MS (QqQ)				
068	0.049	0.02	2	GC-MS (Q)	0.01	-0.73	-0.91	a
069	0.08	0.04	2	GC-MS (Q)	0.02	1.34	0.95	c
070	0.05	0.015	2	LC-MS (QqQ)	0.0075	-0.66	-0.99	a
072	0.054	0.004	2	LC-MS (QqQ)	0.002	-0.39	-0.86	b
073	0.06	0.01	2		0.005	0.01	0.01	b
075	0.067	0.033	2	GC-MS (Q)	0.0165	0.47	0.40	c
077	0.048	0.5	2	LC-MS (QqQ)	0.25	-0.79	-0.05	c
078	0.027	0.01	2	GC-MS (Q)	0.005	-2.20	-3.99	b
079	0.077	0.018	2	GC-MS (Q)	0.009	1.14	1.53	a
080	0.063	0.136	2	GC-MS	0.068	0.21	0.05	c
081	0.065	0.011	2	GC-MS (Q)	0.0055	0.34	0.60	b
082	0.065	0.0325	2	GC-MS (QqQ)	0.01625	0.34	0.29	c
083	0.064	0.01	2	LC-MS (QqQ)	0.005	0.27	0.50	b
084	0.068	0.033	2	GC-ECD	0.0165	0.54	0.46	c
085	0.068	0.02	2	GC-MS (QqQ)	0.01	0.54	0.68	a
086	0.05	0.02	2	GC-MS (Q)	0.01	-0.66	-0.83	a
087	0.059	0.004	2	LC-MS (Q ; QqQ)	0.002	-0.06	-0.13	b



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Elmo Libek,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose LC/ESI/MS meetodi väljatöötamine pestitsiidijääkide määramiseks,

mille juhendaja on Anneli Kruve,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2014**